



Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Fasciola hepatica: diversidade genética e avaliação de SNPs
associados a resistência ao albendazol em Portugal e Brasil

Nataniel Paulino Chinjengue

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE
MESTRE EM PARASITOLOGIA MÉDICA**

(OUTUBRO, 2016)



Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Fasciola hepatica: diversidade genética e avaliação de
SNPs associados a resistência ao albendazol em
Portugal e Brasil

Autor: Nataniel Paulino Chinjengue

Orientadora: Professora Doutora Isabel Maurício

Coorientadora: Professora Doutora Manuela Calado

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Parasitologia Médica.

Apoio financeiro do Serviço de Bolsas Gulbenkian e em articulação com o Programa Gulbenkian Parcerias para o Desenvolvimento, no âmbito das Bolsas de Pós-Graduação para Estudantes Africanos de Língua Oficial Portuguesa e de Timor-Leste

Agradecimentos

À minha Orientadora, Professora Doutora Isabel Maurício e à Professora Doutora Manuela Calado pelos ensinamentos, acompanhamento e pela disponibilidade ao longo da realização deste trabalho.

A todo o grupo de Helminologia do IHMT, em particular à Professora Doutora Silvana Belo e ao Doutor Pedro Ferreira, pelo apoio demonstrado.

À Samira D'Almeida (estudante de doutoramento) por ter gentilmente cedida as amostras brasileiras de *F. hepatica*.

À Doutora Maria do Rosário Sambo da Universidade Agostinho Neto (UAN) pelo incentivo para iniciar este mestrado e conselhos em geral.

À Fundação Calouste Gulbenkian pela Bolsa concedida, sem a qual não teria sido possível este percurso.

A todos os professores e colegas que, de modo direto ou indireto, me deram força para continuar, em particular por ter iniciado o mestrado com três meses de atraso.

Aos meus familiares de forma geral pelo apoio moral e espiritual.

Resumo

Nos últimos anos, em muitos países, incluindo Portugal, a fasciolose tem vindo a ser considerada uma doença emergente, resultando num problema de saúde humana e animal, e com elevado impacto económico. O conhecimento da estrutura genética de populações de *Fasciola hepatica* é essencial quando se avalia o potencial de desenvolvimento e extensão da resistência aos anti-helmínticos, tais como fármacos triclorobendazol e albendazol.

A espécie *F. hepatica* pode ser encontrada em todos os continentes, exceto a Antártida, enquanto que *F. gigantica* se encontra apenas na África e na Ásia. Ambas as espécies de *Fasciola* utilizam como hospedeiros intermediários moluscos de água doce da família Lymnaeidae.

Utilizou-se uma amostra com um total de 94 vermes. Oitenta e sete vermes adultos de *F. hepatica* da coleção do Departamento de Helminologia Médica do IHMT, fixados em etanol a 70% e armazenados a -20 °C, obtidos entre 2009 e 2010 em matadouros de Portugal e provenientes de diversas regiões do país. Sete vermes tinham sido recolhidos no Brasil em 2015. Extraíu-se o DNA genómico através do protocolo de CTAB.

Avaliaram-se três marcadores nucleares: ITS1, para identificação da espécie, o gene ribossomal 28S e o gene para TubB3, que é um marcador candidato de resistência aos fármacos. Avaliou-se também um marcador mitocondrial: citocromo c oxidase I. Os marcadores foram amplificados por PCR e sequenciados. No caso de 28S e de TubB3, SNPs de interesse foram genotipados com PCR específico desenvolvido no âmbito deste trabalho, e no qual se testou a eficiência de desemparelhamentos em bases na 2ª e na 3ª posições antes do extremo 3'. Redes filogenéticas foram geradas, para alinhamentos de sequências com bases ambíguas ou heterozigóticas, no programa SplitsTree4, utilizando o algoritmo NeighborNet e as distâncias calculadas através do modelo Kimura-2- parameter.

A região ITS1 permitiu identificar as amostras como *F. hepatica* e mostrou ser bastante conservada. A região 28S mostrou heterozigotia na posição 115, que separa duas linhagens encontradas no leste Europeu, em todas as amostras Portuguesas e Brasileiras, sugerindo que esteja a ocorrer seleção de heterozigoto ou reprodução partenogénica. As regiões COI e TubB3 apresentaram diversidade intra-populacional em Portugal e no Brasil e em relação a outras regiões, assim como heterozigotia em várias posições, e poderão ser usadas em estudos populacionais alargados desta espécie nos dois países. Contudo, a alteração não sinónima na posição 311 de TubB3 não foi detetada nas amostras estudadas, sugerindo que este gene não está envolvido em resistência a fármacos em *F. hepatica*, pelo menos em Portugal ou no Brasil.

O PCR específico para alelos mostrou ser uma alternativa à sequenciação para genotipagem de SNPs específicos num número grande de amostras, particularmente em estudos populacionais e na pesquisa de marcadores de resistência a fármacos.

Palavras chave: *Fasciola hepatica*, SNPs, genotipagem

Abstract

In recent years, in many countries, including Portugal, fascioliasis has been considered an emerging disease, being a human and animal health problem with high economic impact. Knowledge of the genetic structure of *F. hepatica* populations is essential when evaluating the potential for development and expansion of resistance to anthelmintics, such as triclorobendazole and albendazole.

F. hepatica species can be found on every continent except Antarctica, while *F. gigantica* is only found in Africa and Asia. Both species of the genus *Fasciola* use, as intermediate hosts, fresh water molluscs of the Lymnaeidae family.

Here, it was used a sample with a total of 94 adult flukes. Eighty-seven adult worms of *F. hepatica* from the collection of the Department of Medical Helminthology of the IHMT, fixed in 70% ethanol and stored at -20 ° C, obtained between 2009 and 2010 in Portugal slaughterhouses and from different regions of the country. Seven samples had been collected in Brazil in 2015. Genomic DNA was extracted by the CTAB protocol.

Three nuclear markers were evaluated: ITS1 for species identification, the 28S ribosomal gene and the gene for TubB3, which is a candidate marker of drug resistance. It was also evaluated one mitochondrial marker: cytochrome oxidase I. The markers were amplified by PCR and sequenced. In the case of 28S and TubB3, SNPs of interest were genotyped with specific PCR developed in this work, and in which it was tested the efficiency of base mismatches in the 2nd and 3rd positions in relation to the 3' end. Phylogenetic networks were generated from sequence alignments, which had ambiguous bases or were heterozygous, in the SplitsTree4 programme, using the NeighborNet algorithm and from Kimura-2-parameter model distances.

ITS1 sequencing identified the samples as *F. hepatica* and was shown to be highly conserved. The 28S region showed heterozygosity at position 115, which separates two lineages found in Eastern Europe, in all Portuguese and Brazilian samples, suggesting there might be heterozygote selection or parthenogenic reproduction at play. The COI and TubB3 regions presented with intra-populational diversity in Portugal and Brazil in relation to other world regions and with heterozygosity at various positions. These markers can, thus, be used in wider population studies for this species in both countries. However, the non-synonymous change at TubB3 position 311 wasn't detected in the samples analysed, suggesting that this marker is not involved in drug resistance in *F. hepatica*, at least in Portugal or Brazil.

The allele specific PCR could be an alternative to full sequencing for genotyping SNPs in a large number of samples, particularly in population studies and research drug resistance markers.

Key-words: *Fasciola hepatica*, SNPs, genotyping

Índice

Agradecimentos.....	i
Resumo	ii
Abstract.....	iii
Lista de abreviaturas	vi
1. Introdução	1
1.1. Fasciolose.....	1
1.2. O género <i>Fasciola</i>	4
1.2.1. Morfologia e fisiologia	5
1.2.2. Distribuição.....	8
1.2.3. Ciclo de vida.....	9
1.2.4. Taxonomia	11
1.3. Hospedeiros intermediários de <i>Fasciola</i> spp.	13
1.4. Manifestações clínicas	16
1.5. Diagnóstico	18
1.6. Prevenção e controlo	18
1.7. Tratamento e resistência	19
1.8. Diversidade genética de <i>Fasciola hepatica</i>	20
1.9. Objetivos.....	24
2. Material e Métodos.....	26
2.1. Amostra	26
2.2. Extração e quantificação de DNA	27
2.3. Amplificação por PCR	27
2.4. Amplificação específica para alelos por PCR (SNPs)	28
2.5. Sequenciação de DNA	29
2.6. Análise de sequências	29
2.7. Análise populacional	30
3. Resultados	31
3.1. Avaliação de DNA extraído	31
3.2. PCR específico para alelos.....	31
3.3. ITS1.....	32
3.4. COI.....	33
3.5. 28S.....	36

3.6. Beta-tubulina 3	38
4. Discussão	41
5. Conclusões	45
Referências Bibliográficas	46
Anexo 1	57
Anexo 3	65
Anexo 4	74
Anexo 5	79
Anexo 6	82

Lista de abreviaturas

ABZ - Albendazol

TubB3 - Beta tubulina 3

COI - Citocromo oxidase c subunidade I

CTAB - Brometo de cetiltrimetilamónia

Cytb - Genes citocromo B

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido desoxirribonucleico

ELISA - Ensaio de imunoabsorção enzimática

IHMT - Instituto de Higiene e Medicina Tropical

ITS - Espaçador transcrito interno

MgCl₂ - Cloreto de magnésio

min - Minuto

mtDNA- DNA mitocondrial

ND4 - Desidrogenase subunidade 4

nDNA - DNA nuclear

PCR - Reação em cadeia da polimerase

RAPD - Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso

RNA - Ácido ribonucleico

rpm - Rotações por minuto

SNP - Polimorfismo de nucleótido único

spp - (Plural) indica várias espécies

TCBZ - Triclabendazol

% - Por cento

°C - Grau Celsius

µl - Microlitro

Capítulo 1 – Introdução

1. Introdução

1.1. Fasciolose

A fasciolose é uma doença causada por parasitas pertencentes ao filo Plathelminthes, classe Trematoda (Digenea), família Fasciolidae, género *Fasciola* e das espécies *Fasciola hepatica* e *Fasciola gigantica*, sendo esta última restrita ao Velho Mundo. A espécie *F. hepatica* pode ser encontrada em todos os continentes, exceto a Antártida, enquanto que *F. gigantica* se encontra apenas na África e na Ásia (MAS-COMA *et al.*, 2005), onde as duas espécies coexistem. Ambas as espécies de *Fasciola* utilizam como hospedeiros intermediários moluscos de água doce da família Lymnaeidae (BARGUES *et al.*, 2001). Estes parasitas ocorrem numa vasta gama de hospedeiros definitivos animais, tendo uma ampla distribuição geográfica. Nenhum continente habitado está livre de fasciolose (WHO, 2014), a qual é uma doença humana e animal, considerada uma zoonose emergente ou re-emergente em várias partes do mundo (VILLEGAS *et al.*, 2012).

O desenvolvimento da doença é caracterizado, na fase aguda pela presença dos parasitas jovens no parênquima hepático e, na fase crónica, pelos adultos nos ductos biliares (BORAY, 1969). Nos últimos anos, em muitos países, incluindo Portugal, esta parasitose tem vindo a ser considerada uma doença emergente, resultando num problema de saúde humana e com elevado impacte económico. *F. hepatica* é comum em zonas temperadas, especialmente na Europa, América do Sul e Austrália. A resistência a anti-helmínticos é cada vez mais reportada (FAIRWEATHER, 2011).

Revela-se como uma das doenças zoonóticas de maior importância em animais de produção pecuária no mundo. No gado bovino, resulta normalmente numa doença subclínica, porém, as consequências económicas são normalmente bastante significativas e associadas, principalmente, com as elevadas condenações de fígados nos matadouros, mortalidade, perda de peso, letargia, redução em produção de leite, às infeções bacterianas secundárias, à interferência com a fertilidade e aos altos custos com tratamentos anti-helmínticos (SERRA-FREIRE, 1995; ECHEVARRIA, 2004). Martínez-Moreno *et al.*, (1999) afirmam que ovinos e caprinos são espécies muito suscetíveis ao parasitismo por *Fasciola* spp., não possuem resistência a reinfeção e frequentemente morrem de fasciolose aguda. A fasciolose é caracterizada por sinais clínicos típicos de doenças hepáticas (FORTES, 2004) e é mais grave em ovinos do que

em bovinos, devido ao tamanho do fígado de ovinos e por estes não adquirirem uma resposta imune natural contra o parasita ao longo da idade. Espécies de animais domésticos, além de ovinos e bovinos, também podem desempenhar um papel importante como reservatórios para os seres humanos, especialmente suínos, asininos e bubalinos, em função do local e do sistema sanitário de criação (MAS-COMA *et al.*, 1997).

A infecção em seres humanos pode ocorrer pelo consumo de pratos especiais preparados com fígado cru em países asiáticos (SCHACHER *et al.*, 1965). Mas a fasciolose humana está principalmente associada à ingestão de agrião ou de outras plantas aquáticas infetadas com metacercárias (BORAY *et al.*, 1997).

Para a ocorrência da fasciolose é necessário uma série de fatores. Dentre estes, incluem-se: a presença de seus hospedeiros intermediários, que são moluscos do género *Lymnaea*, uma temperatura ambiente entre 10°C e um pouco mais que 25°C (RAPSCH *et al.*, 2008), humidade e precipitação elevada, além de fatores geomorfológicos (ROJO-Vazquez *et al.*, 2012). A precipitação pode favorecer a acumulação de água, condição indispensável para o ciclo da doença, e que geralmente ocorre em terreno mais plano ou menos montanhoso, onde as elevações são mais baixas. Por isso, além das variáveis climáticas, outras condições como altitude, alta humidade do solo, proximidade de extensas áreas hidrográficas inundadas ou pântanos, também contribuem para a proliferação dos moluscos do género *Lymnaea* (MÜLLER *et al.*, 1997). As condições climáticas são críticas para o desenvolvimento de ambos, parasita e hospedeiro, *Fasciola* spp. e *Lymnaea* spp. O molusco resiste melhor a baixas temperaturas do que às altas temperaturas. Sobrevivem ao inverno, embora exista pouco ou nenhum desenvolvimento e multiplicação. Por outro lado, altas temperaturas persistentes e condições húmidas, são contrárias às populações de moluscos (MENDES, 2006). As formas infetantes para o hospedeiro definitivo, as metacercárias, sobrevivem nas plantas aquáticas por longos períodos a baixas temperaturas se o nível de humidade for suficiente. No entanto não resistem à dessecação a temperaturas superiores a 25°C. Em áreas com altas temperaturas e baixa humidade, como no deserto do Saara, poucos casos de fasciolose são relatados. Em contraste, a alta humidade associada à alta pluviosidade e moderada temperatura são precursores de hiperendemicidade de infecção

por *Fasciola* spp. em animais herbívoros e consequentemente em humanos (MENDES, 2006).

As espécies do género *Fasciola* são vermes do fígado comuns de uma ampla variedade de animais (MAS-COMA *et al.*, 2005). Este parasita provoca efeitos devastadores na saúde animal, humana e a nível socioeconómico. Num estudo realizado em 2005, estimou-se que perto de 600 milhões de animais e 2,4 milhões de pessoas de 61 países espalhados por todo o mundo sofrem de fasciolose com perdas económicas estimadas em 3200 milhões de dólares americanos por ano (cerca de 2400 milhões de euros) (MAS-COMA, 2005). Para além do impacto económico negativo grave devido a fasciolose em ruminantes (URQUHART *et al.*, 1996), a fasciolose humana representa um importante problema de saúde. Estima-se haver entre 2,4 e 17 milhões de pessoas infetadas e um número de pessoas em risco superior a 180 milhões em todo o mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1995; MAS-COMA *et al.*, 1999). Embora tenham uma distribuição geográfica global, a doença provavelmente exerce a maior parte de seu impacto nos países em desenvolvimento. Na África, a infeção por *Fasciola* tem sido reconhecida como um dos principais entraves para a indústria e pecuária, da saúde pública e animal (MEKROUD *et al.*, 2006).

As parasitoses devidas a tremátodes em geral tornaram-se uma prioridade devido a recentes modificações nas prevalências, intensidades e distribuição geográfica, como consequência dos efeitos da mudança climática e da mudança global (BOISSIER *et al.*, 2015). Os tremátodes de origem alimentar foram especialmente enfatizados no relatório recente da OMS para doenças tropicais negligenciadas 2015-2020 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013). Entre eles, a fasciolose merece uma atenção particular devido à sua importância médica e veterinária e impacto nas populações e na economia (MAS-COMA *et al.*, 2009a). Esta parasitose zoonótica é emergente em muitos países, com deteção progressiva de novas áreas endémicas e um número crescente de relatos de casos humanos, estando esta expansão relacionada com alterações climáticas (MAS-COMA *et al.*, 2008) e ambientais, como modificações antrópicas do meio ambiente (AFSHAN *et al.*, 2014), aumento das viagens (ASHRAFI *et al.*, 2014) e de importação / exportação de gado vivo (MAS-COMA *et al.*, 2009a).

Originária da Europa, a espécie *F. hepatica* alcançou todos os continentes possivelmente devido à colonização, o transporte e o livre comércio de animais. A

primeira referência à doença reporta a 1379 por Jehan de Brie e, desde então, a família Fasciolidae Railliet, 1895 incorpora os parasitas que habitam os canais biliares de herbívoros domésticos e selvagens em diferentes partes do mundo (ROJO-VAZQUEZ *et al.*, 2012). A propagação desta espécie é em parte causada por sua adaptabilidade a diferentes moluscos hospedeiros e a introdução de animais infetados ou de suscetíveis hospedeiros limneídeo em novas áreas (MEUNIER *et al.*, 2001).

A infecção por *F. gigantica* é considerada como uma das infecções por helmintas mais comum de ruminantes na Ásia e África (HARRISON, HAMMOND & SEWELL 1996). A sua importância económica é principalmente devido à mortalidade associada, mas mesmo as infecções subclínicas causam grandes perdas de eficiência da ração, de peso, de produção de leite, de desempenho reprodutivo, da qualidade de carcaça e do rendimento do trabalho em animais de tração, e aumentam a condenação de fígados de abate (VASSILEV & JOOSTE 1991).

1.2. O género *Fasciola*

As espécies do género *Fasciola* parasitam principalmente grandes mamíferos herbívoros. Apenas duas espécies foram detetadas nos seres humanos. Estas são a *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758, *Fasciola gigantica* Cobbold, 1856. Outras espécies incluem *Fasciola magna* Bassi, 1875, que pode causar considerável morbidade e mortalidade em hospedeiros ruminantes, e *Fasciola jacksoni* Cobbold, 1869, ou *Protofasciola robusta* Lorenz, 1881, que podem causar mortes de elefantes asiáticos e africanos, respetivamente (VITOVEC *et al.*, 1984; MAS-COMA E BARGUES, 1997).

1.2.1. Morfologia e fisiologia

O género *Fasciola* pertence à Classe Trematoda. Os tremátodes são helmintas muito abundantes, geralmente visíveis a olho nu. Os tremátodes digenéticos são achatados dorsoventralmente e quase sempre providos de ventosas, estruturas importantes na fixação do organismo ao seu habitat no hospedeiro definitivo. Somente na subclasse Digenea, a que pertence o género *Fasciola*, há espécies de interesse médico. O género *Fasciola* apresenta uma morfologia em forma de folha (FERREIRA, 2012) (Figura 2). Normalmente, as características morfológicas, tais como a forma do corpo e o perímetro, bem como relação comprimento/largura, comprimento do cone cefálico e comprimento da área por trás dos testículos são usadas para identificar o verme adulto de *Fasciola*. No entanto, tais critérios fenotípicos não são completamente fiáveis para a diferenciação específica, devido a uma variação considerável e / ou sobreposição de medidas entre *F. hepatica* e *F. gigantica* (LOTFY *et al.*, 2002; PERIAGO *et al.*, 2008).

Os vermes adultos de *F. gigantica* e de *F. hepatica* vivem nos ductos biliares do fígado, onde podem atingir um comprimento de até 7,6 cm no caso de *F. gigantica* ou 3 cm se *F. hepatica* (MAS-COMA, 2004) por 1,5 cm de largura e têm uma cor pardo acinzentada. Apresentam uma ventosa oral (localizada na extremidade anterior), da qual segue uma faringe curta (Figura 1). Da faringe, partem ramos cecais (um de cada lado) até à extremidade posterior. Os cecos são extremamente ramificados. Logo abaixo da ventosa oral vê-se a ventosa ventral ou acetábulo, junto da qual, nota-se a abertura do poro genital (GUIMARÃES, 2005).

Esses parasitas são hermafroditas, possuindo as seguintes características: aparelho genital feminino - um ovário (ramificado), oótipo, útero e glândulas vitelinas (extremamente ramificadas, ocupando as partes laterais e posterior do parasita), e aparelho genital masculino - dois testículos (muito ramificados), canal eferente, canal deferente e bolsa do cirro (órgão copulador). O tegumento apresenta-se coberto por espinhos recorrentes disseminados na porção anterior do helminta (GUIMARÃES, 2005) (Figura 1).

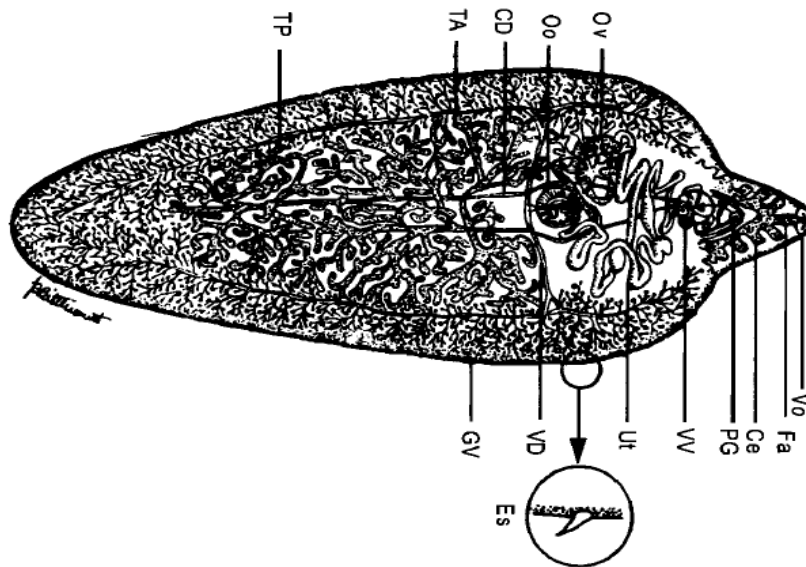


Figura 1: *F. hepatica*: representação esquemática de um exemplar: Vo - ventosa oral; Fa - faringe; Ce - ceco (sem o restante da representação); Pg - poro genital; VV - ventosa ventral; Vt - útero; VD - viteloduto; GV - glândulas vitelínicas; Ov - ovário; Oo - oótipo; Cd - canal deferente; TA - testículo anterior; JP - testículo posterior; Es - espinhos cuticulares (1.000 x) que recobrem a cutícula do helminta. Fonte: (GUIMARÃES, 2005).



Figura 2. *F. hepatica* (adulto) - 30 mm por 13 mm. Fonte: <http://www.cdc.gov/parasites/fasciola/epi.html>

Os ovos de *F. hepatica* são operculados, de cor amarela, ligeiramente acastanhada, ovais e não são embrionados quando expelidos nas fezes (Figura 3). É essencial que o ovo entre em contacto com a água para iniciar o desenvolvimento do embrião/larva. A taxa de desenvolvimento dos ovos aumenta com a temperatura na gama de 10 a 30, tendo de 6 meses a 10 °C, 2-3 meses a 16 °C, de 2-3 semanas a 24 °C e 8 dias a 30°C. O desenvolvimento do ovo é inibido consideravelmente acima de 30°C e completamente acima de 37 °C, temperatura à qual também aumenta a mortalidade (ANDREWS, 1999).

No interior dos ovos desenvolve-se a larva, chamada de miracídio. O miracídio tem forma cónica, está coberto com cílios e pode ter até 130 µm por 30 µm. Após a eclosão, o miracídio infecta um molusco aquático, que atua como hospedeiro intermediário. No molusco, o parasita sofre reprodução mitótica por poliembrião, passando por estágios conhecidos como esporocistos, e eventualmente rédias, até originarem numerosas formas infetantes móveis conhecidas como cercárias (FERREIRA, 2012). A cercária de *Fasciola* spp. tem duas ventosas, um corpo arredondado medindo entre 250-350 µm de comprimento e uma cauda longa e fina não ramificada medindo cerca de 500 mm de comprimento (MAS-COMA, 2004). As cercárias enquistam-se na superfície de plantas aquáticas, na forma de metacercárias.

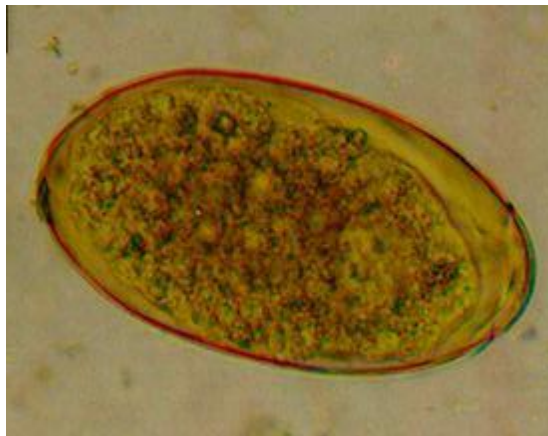


Figura 3: Ovo de *F. hepatica* (130-150 µm) exibindo a casca fina e opérculo num dos pólos. Fonte: REY, (2002).

1.2.2. Distribuição

A espécie *F. hepatica* tem uma distribuição cosmopolita, principalmente em zonas temperadas, enquanto que *F. gigantica* se encontra em regiões tropicais da África e Ásia. (MAS-COMA *et al.*, 2005). *F. hepatica* expandiu-se, a partir de sua origem europeia, a todos os cinco continentes, enquanto que *F. gigantica* permaneceu restrita à África e na Ásia (incluindo Hawaii), um fenómeno biogeográfico que parece refletir a incapacidade, até agora, do grupo *Radix* para expandir e colonizar outros continentes. As exigências ecológicas dos respetivos vetores limneídeos podem explicar a maior prevalência de *F. hepatica* em zonas temperadas, incluindo toda a Europa, Américas e Oceania, enquanto que *F. gigantica* está adaptada ambientalmente às zonas tropicais e húmidas que são predominantes na África e Ásia (MAS-COMA *et al.*, 2009a). No geral, a capacidade do género *Fasciola* para infetar um número de diferentes hospedeiros mamíferos é considerada um dos fatores responsáveis pela sua ampla cobertura geográfica (MAS-COMA *et al.*, 2005).

Devido à estrita dependência em relação às condições climáticas necessárias para o desenvolvimento e sobrevivência das formas larvares de *F. hepatica* e de seus hospedeiros intermediários, as atuais e futuras alterações climáticas globais podem influenciar a distribuição do hospedeiro intermediário e do parasita. Alguns estudos sugerem que surtos ocasionais da fasciolose poderão surgir devido à expansão geográfica de seus hospedeiros intermediários (MAS-COMA *et al.*, 2009a).

O melhoramento do diagnóstico em humanos revelou que várias áreas geográficas são consideradas endémicas para a doença, que é essencialmente cosmopolita (MAS-COMA *et al.*, 2005) (Figura 4).



Figura 4. Distribuição global de fasciolose humana, de acordo com os dados da OMS, 2013. Fonte: Ashrafi *et al.*, (2014).

1.2.3. Ciclo de vida

Os tremátodes da subclasse Digenea são endoparasitas obrigatórios, com ciclos de vida complexos (heteroxénicos) que envolvem pelo menos dois hospedeiros distintos. A reprodução sexuada ocorre no hospedeiro vertebrado. A maioria dos tremátodes digenéticos, com exceção dos membros da família Schistosomatidae, é hermafrodita.

Os elementos essenciais para a manutenção do ciclo de *Fasciola*: são o parasita; hospedeiro definitivo, sendo humanos e animais; hospedeiro intermediário, neste caso moluscos aquáticos; e hábitos alimentares, tais como, a ingestão de um transportador, plantas aquáticas e semi-aquáticas (WHO, 2007).

A presença de áreas alagadas favorece a manutenção do ciclo biológico do parasita por ser um ambiente imprescindível para o desenvolvimento do molusco (MUNGUÍA-XÓCHIHUA *et al.*, 2007).

Os hospedeiros definitivos de *Fasciola* spp. são espécies de animais domésticos e silvestres, com maior ocorrência em ruminantes, e, acidentalmente, mas com grande frequência, os seres humanos (ZAIDEN *et al.*, 2008). O género *Fasciola* tem um ciclo de vida heteroxénico, uma vez que necessita de hospedeiro intermediário, especificamente moluscos gastrópodes do género *Lymnaea*.

O ciclo de vida inicia-se pela eliminação de ovos nas fezes do hospedeiro definitivo. Se o ambiente for húmido, como em locais alagados, no interior do ovo desenvolve-se o miracídio, considerado a primeira fase larval, normalmente entre 9 a 14 dias sob condições ótimas de luminosidade, temperatura e humidade. Os miracídios permanecem no ambiente aquático por até 6 horas, movimentando-se por meio de cílios ordenados até encontrar seus hospedeiros intermediários, moluscos gastrópodes do género *Lymnaea* (URQUHART *et al.*, 1996; KAPLAN, 2001). Após penetrar o molusco através da sua massa visceral, a larva perde o envoltório ciliado e transforma-se em esporocisto, dentro dos quais, por meio de sucessivas divisões mitóticas de células germinativas, terão origem as rédias. Destas, desenvolvem-se novas estruturas dotadas de caudas móveis, as cercárias, que ao fim de 5 a 7 semanas, se libertam do corpo do molusco. As cercárias libertam-se do molusco por meio de estímulos externos: alterações de temperatura e intensidade da luz (FORTES, 2004). As cercárias nadam ativamente até fixar-se sobre um substrato, geralmente sobre a vegetação, perdem a cauda e, graças a células quistogénicas que secretam um invólucro protetor, enquistam-se, transformando-se em formas resistentes e infetantes, as metacercárias (HATSCHBACH, 1995; MITCHELL, 2004).

Os hospedeiros definitivos infetam-se quando se alimentam dessa vegetação aquática contaminada, em suspensão no solo ou até mesmo pela ingestão da água contaminada pelas formas infetantes. Ao atingir o intestino delgado do hospedeiro definitivo, a metacercária atravessa a parede intestinal, entra na circulação sanguínea alojando-se no fígado e ductos biliares (KAPLAN, 2001; FORTES, 2004). Em cerca de 5 semanas, as formas juvenis migram pelo parênquima hepático formando túneis e causando a destruição dos hepatócitos e endotélio com acentuada hemorragia até alcançarem o ducto biliar e atingirem a maturidade sexual. Cerca de 60 dias após a instalação da infeção no hospedeiro, inicia-se a postura dos ovos, que via canal colédoco, chegam ao intestino onde serão eliminados junto com as fezes, garantindo assim a manutenção do ciclo (SERRA-FREIRE, 1995) (Figura 5).

Destaca-se que embora o ciclo de *Fasciola* spp. obedeça aos mesmos padrões de desenvolvimento, os perfis de transmissão podem ser diferentes para determinadas regiões geográficas, o que dependerá dos fatores ambientais e climáticos envolvidos,

como a temperatura, a altitude, a precipitação e presença de hospedeiros intermediários do género *Lymnaea* (KAPLAN, 2001).

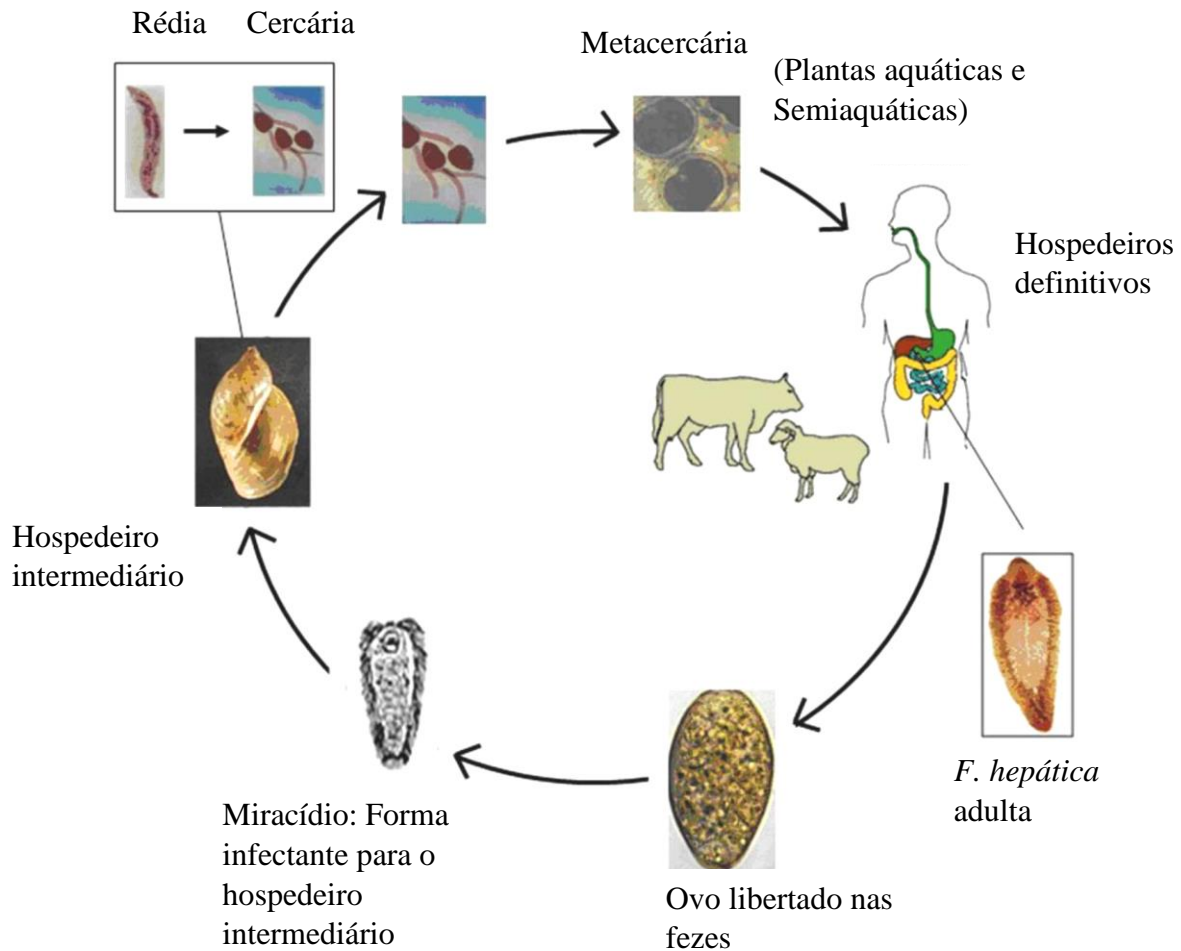


Figura 5: Ciclo de vida de *Fasciola* spp. Fonte: Carvalho *et al.*, (2005)

1.2.4. Taxonomia

A fasciolose é uma doença causada por parasitas pertencentes ao filo Plathelminthes, classe Trematoda, família Fasciolidae, sendo os agentes causadores as espécies *Fasciola hepatica* e *Fasciola gigantica*. Estes organismos são facilmente reconhecidos devido características anatómicas peculiares, como corpo achatado dorso-ventralmente e foliáceo, coloração avermelhada e revestidos por uma fina cutícula (OLIVEIRA e FILHA, 2009).

A família Fasciolidae é relativamente pequena composta de apenas sete espécies reconhecidas (VITOVEC *et al.*, 1984; MAS-COMA e BARGUES, 1997).

As espécies incluem: *Fasciola hepatica*, *Fasciola gigantica*, *Fasciola jakcsoni*, *Fascioloides magna*, *Fasciolopsis buski*, *Parafasciolopsis fasciolaemorpha* e *Protofasciola robusta*. As duas primeiras espécies têm maior relevância e estão mais disseminadas mundialmente (ROBERTS & JANOBY, 2009). A classificação taxonômica da família Fasciolidae tem sido controversa por décadas. Apesar de várias espécies terem sido descritas dentro do gênero *Fasciola*, apenas *Fasciola hepatica* e *Fasciola gigantica* foram reconhecidas taxonomicamente como agentes causadores da fasciolose em animais e humanos (MAS-COMA *et al.*, 2005).

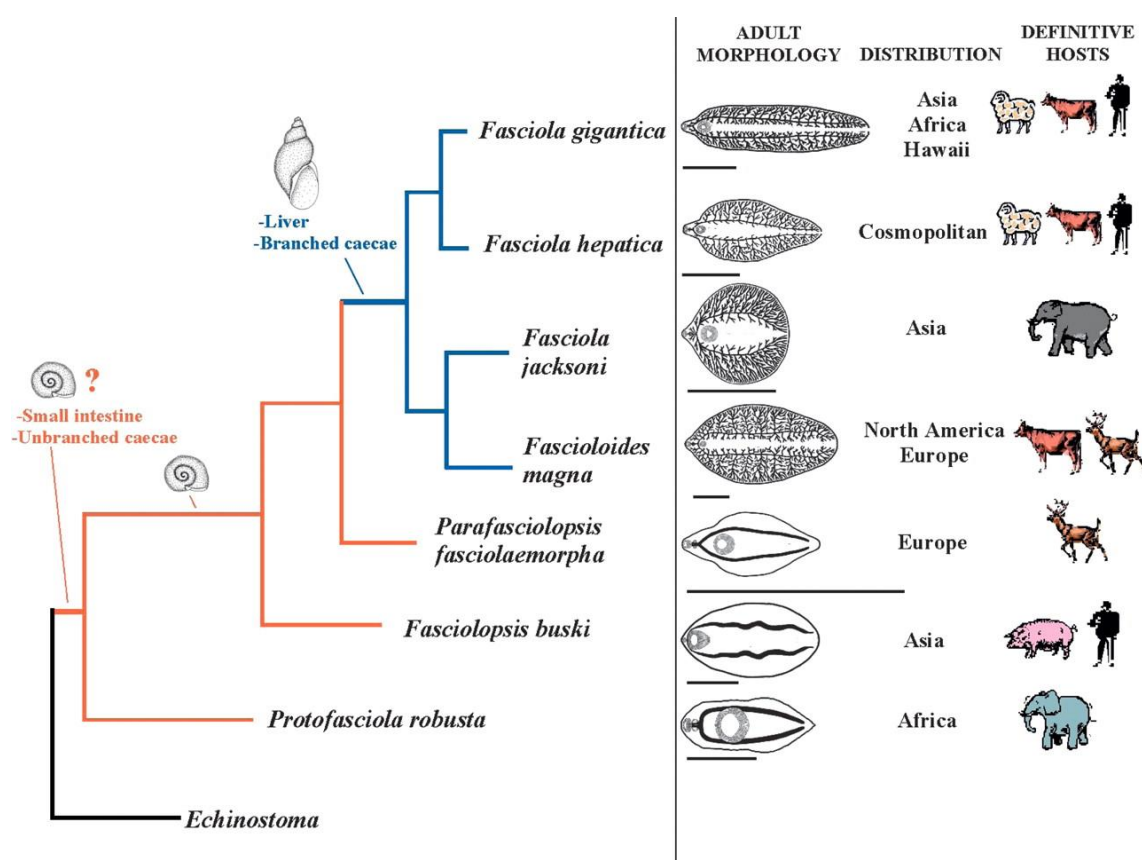


Figura 6: Padrões de mudanças significativas em hospedeiros, morfologia e distribuição (escala bar: 10 mm). Fonte: LOTFY *et al.*, (2008).

A classificação taxonómica de *Fasciola* spp. de acordo com Lofty *et al.* (2008) é:

Filo Platyhelminthes

Subfilo Neodermata

Classe Trematoda

Subclasse Digenea

Superorder Anepitheliocystida

Ordem Echinostomida

Subordem Echiostomata

Superfamília Echinostomatoidea

Família Fasciolidae

Género *Fasciola*

1.3. Hospedeiros intermediários de *Fasciola* spp.

Os parasitas do género *Fasciola* requerem um molusco aquático do género *Lymnaea* como hospedeiro intermediário para completar seu ciclo biológico, que tem uma distribuição geográfica com amplitude latitudinal, longitudinal e de altitude conhecida (MAS-COMA *et al.*, 2003). Assim, a epidemiologia desta parasitose relaciona-se a fatores climáticos, topográficos e ambientais, como a presença de água, que estão relacionados com a biologia dos hospedeiros intermediários (GASSENBECK *et al.*, 1992).

A sistemática da família Lymneidae tem uma longa e controversa história e ainda hoje a definição de critérios de classificação é um tema de estudo (CORDERO DEL CAMPILLO E ROJO-VÁZQUEZ, 1999). Em particular o género tem sido designado *Lymanea* ou *Galba*, de acordo com diferentes grupos de investigação.

Os estudos taxonómicos e parasitológicos sobre as espécies da família Lymnaeidae são necessários e fornecem informações complementares, uma vez que a identificação das espécies é relevante para a avaliação de áreas de risco da fasciolose associadas com a presença e/ou infeção desses hospedeiros intermediários (SIERRA *et al.*, 2009) **Cit.** por (CARVALHO, 2014). Entretanto, a taxonomia desse grupo apresenta dificuldades, que têm vindo a ser superadas por meio da utilização de ferramentas moleculares, abordagem morfométrica, bem como a busca de caracteres taxonómicos

(SAMADI *et al.*, 2000; CARVALHO *et al.*, 2004; CARDOSO *et al.*, 2006; CORREA *et al.*, 2011) **Cit.** por (CARVALHO, 2014).

Várias espécies de moluscos do género *Lymnaea* podem ser hospedeiras intermediárias do ciclo biológico de *F. hepatica*. Dentre eles destacam-se as espécies *L. columella* (Say, 1817), *L. truncatula* (Thomas, 1883), *L. viatrix* (Orbigny, 1835), *L. cubensis* (Krull, 1933), *L. philippinensis* (Jesus, 1935), *L. stagnalis*, *L. peregrina* (Clessin, 1882), *L. rupestris*, *L. oahuensis*, *L. rubella*, *L. tenuistratus*, *L. previa*, *L. japonica*, *L. natalensis* além de algumas espécies de moluscos de outros géneros como *Bulinus tropicus* (Lemaire, 1936), *Physa fontinalis*, *Physa cubensis* e *Physa venustula* (SERRA-FREIRE, 1995).

A família Lymnaeidae é caracterizada como tendo uma concha de tamanho e formato variáveis (até 70 mm em comprimento, subangulada ou turriculada a oval cónica ou auriculada), próstata não pregueada ou com uma ou várias (5 a 10) pregas internas, e número cromossómico haplóide de 18 a 19 (CARVALHO, 2014).

É comum o agrupamento de espécies em subcategorias, em que as espécies estão relacionadas entre si, no que diz respeito à morfologia ou origem do taxon. Entre os limneídeos, alguns grupos, como no caso de *Galba/Fossaria*, são tratados como subgéneros do género *Lymnaea* sensu lato que abrange o maior número de espécies. Dessa forma, na Europa teríamos somente um representante do género *Galba* que seria *G. truncatula*, enquanto as espécies do grupo Neotropical, *G. viatrix*, *G. cubensis* e *G. neotropica* estariam classificadas no género sinónimo *Fossaria*. A nomeação do género *Lymnaea* sensu stricto, inclui poucas espécies, cuja característica comum é possuir o ápice agudo na espira da concha. Neste caso, na Europa apenas uma espécie foi reconhecida, a espécie tipo *Lymnaea stagnalis* (Linnaeus, 1758), sendo as outras espécies incluídas nos géneros *Galba*, *Fossaria* e *Pseudosuccinea*. Entretanto, devido à pequena resolução sistemática e discordância dos dados obtidos, cada autor propõe uma classificação, não havendo consenso para o melhor arranjo taxonómico desse grupo, sendo sua sistemática tratada de acordo com o critério utilizado por cada pesquisador (BARGUES *et al.*, 2001). Alguns autores consideram como válidos vários géneros e subgéneros (MALEK, 1985) **Cit.** por (CARVALHO, 2014), outros apenas aceitam utilizar o nome genérico *Lymnaea*, seguindo a classificação de Hubendick (1951). Entretanto, o agrupamento desse género em subgéneros, como *Galba/Fossaria*, tem

servido como meio conveniente para a identificação dos grupos de espécies relacionadas (CARVALHO, 2014).

Lymnaea truncatula tem a seguinte classificação (CORDERO del Campillo e ROJO-Vázquez, 1999): Reino Animalia,

Subreino Metazoa,

Filo Mollusca,

Classe Gastropoda,

Subclasse Pulmonata,

Ordem Basommatophora,

Família Lymnaeidae,

Género *Lymnaea*.

Espécie preferencial na Europa é *Lymnaea truncatula*.

As seguintes distribuições de espécies:

L. tomentosa Austrália, Nova Zelândia

L. columella América do Norte, Austrália, Nova Zelândia

L. bulimoides Sul dos Estados Unidos, Caribe

L. humilis América do Norte

L. viator América do Sul

L. diaphena América do Sul

As espécies de *Fasciola* podem adaptar-se a novos hospedeiros intermediários, sob certas condições, pelo menos com base em ensaios de laboratório. O mais importante hospedeiro intermediário de *F. gigantica* é a espécie *Radix auricularia*. No entanto, outras espécies também são conhecidas por permitir o desenvolvimento do parasita incluindo *Lymnaea rufescens* e *Lymnaea acuminata* no subcontinente indiano; *Radix rubiginosa* e *Radix natalensis* na Ásia e na África respetivamente (CORREA *et al.*, 2010; DAR *et al.*, 2005) (figura 7).

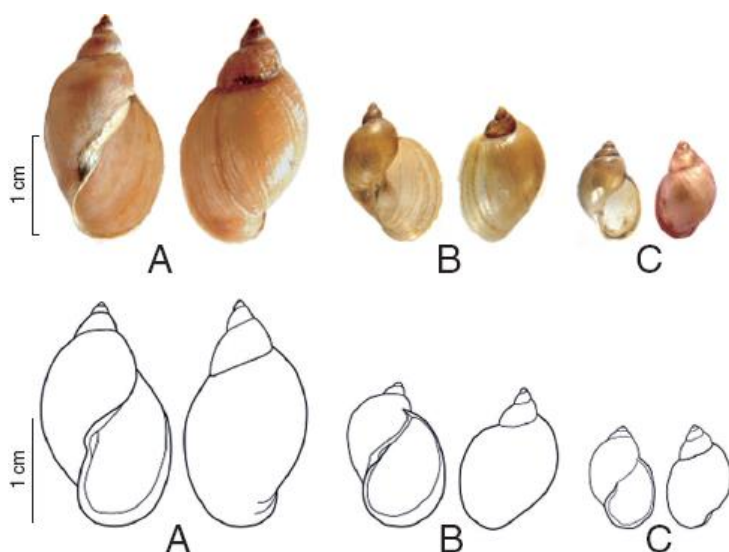


Figura 7: Morfologia dos caracóis. (A) *Radix rubiginosa* (= "*Lymnaea* sp ."). (B) *Radix auricularia* ("*L. swinhoei*") . (C) *Austropeplea viridis* (= "*L. viridis*")

Fonte: Dung *et al.*, (2013)

1.4. Manifestações clínicas

Como referido anteriormente, a fasciolose é reconhecida como uma importante doença de animais domésticos e seres humanos em todo o mundo, causando perdas económicas significativas e preocupação de saúde pública (MAS-COMA *et al.*, 2005).

O desenvolvimento da infeção por *Fasciola* spp. é bastante diferente em ovinos e bovinos. Raramente a fasciolose aguda chega a provocar mortes em bovinos, porém em ovinos a mortalidade pode atingir índices que variam entre 15 e 20%. Os bovinos desenvolvem uma gradual resistência às infeções enquanto que os ovinos são altamente sensíveis. De entre as diferenças patológicas verificadas nas duas espécies após a infeção, destaca-se o grau de calcificação das lesões tecidulares e a hiperplasia dos ductos biliares. Ambas as reações são mais evidentes em bovinos do que em ovinos. Em bovinos pode ocorrer uma recuperação espontânea devido à calcificação dos ductos biliares, o que pode provocar inanição e morte do parasita (ECHEVARRIA, 2004).

A fasciolose compreende um processo inflamatório crónico do fígado e ductos biliares causado por infeção com parasitas do género *Fasciola*. É mais grave nos animais quando a migração de uma grande quantidade de formas imaturas no fígado ao mesmo tempo causa uma hepatite traumática e hemorragia (GUIMARÃES, 2005). A infeção pode causar lesões irreversíveis e tornar-se uma doença crónica causando

fibrose e trauma severo, devido à migração das formas jovens e à presença das formas adultas no parênquima hepático. Por atingir preferencialmente os ruminantes, como bovinos, ovinos e caprinos, é uma doença de grande importância veterinária, causando danos diretos ao animal e elevadas perdas económicas. Sendo uma zoonose, tornou-se também uma enfermidade de grande importância na saúde pública, ao afetar os seres humanos (HAROUN & HITLYER, 1986; SERRA-FREIRE, 1999).

A infecção humana, considerada como acidental, ocorre principalmente pela ingestão de metacercárias enquistadas em hortaliças aquáticas e semi-aquáticas, como agrião e alface (RONDELAUD *et al.*, 2000).

Quando ingeridas, as metacercárias ativamente atravessam a parede do intestino delgado em direção à cavidade peritoneal, vindo a penetrar a cápsula hepática, sendo a fase aguda de poucos dias a até quatro meses em humanos. Os sinais e sintomas não são específicos, pois são comuns a outras doenças do aparelho digestivo. Os sinais agudos mais comuns em humanos são hepatomegalia dolorosa, febre, episódios de dor na região do hipocôndrio, por vezes associados a náuseas e vômitos, icterícia, colúria e dor abdominal bem como astenia e tonturas, e ainda urticária. A fase crónica é caracterizada pela presença dos parasitas adultos nos ductos biliares, eliminando ovos pelas fezes. Nesta fase, há dor intermitente, anemia, podendo apresentar complicações como pancreatite e fibrose hepática, devida à inflamação crónica (INVS, 2003; CORAL *et al.*, 2007; WHO, 2007). Podem ocorrer, ainda, ciclos ectópicos, com parasitismo de outros órgãos como intestino, tecido subcutâneo, cérebro e pele (XUAN *et al.*, 2005).

A crescente importância da fasciolose humana tem sido evidenciada em estudos recentes de patogenicidade e imunidade, incluindo dificuldades de diagnóstico (MAS-COMA *et al.*, 2014a). A complexidade do quadro clínico, e os sintomas e as síndromes devido à capacidade dos vermes para afetar outros órgãos vitais, dando origem a sequelas importante e até mesmo a morte (MAS-COMA *et al.*, 2014b), faz aumentar a preocupação sobre uma doença cuja morbidade alta em humanos já havia sido destacada vários anos antes pela Organização Mundial de Saúde (CHEN E MOTT, 1990).

1.5. Diagnóstico

O tremátode adulto normalmente é encontrado apenas a partir de exame histopatológico *in situ*, isto é, em necropsias, sendo o diagnóstico confirmado com a detecção do parasita. Em geral, as formas juvenis são encontradas no parênquima hepático, na fase aguda, e as formas adultas nos ductos biliares, na fase crónica (RIET-CORREA *et al.*, 2001; MENDES, 2006).

No exame do conteúdo fecal podem ser encontrados ovos, na fase crónica, mas não na fase aguda ou subaguda, apesar de já existirem alterações patológicas características da infeção. Nestas fases iniciais o diagnóstico é baseado em testes de laboratório que detetam enzimas libertadas no sangue, caracterizando a infeção no parênquima hepático e lesões dos ductos biliares (MENDES, 2006).

Testes serológicos para o diagnóstico da infeção, foram desenvolvidos e são uma alternativa, por exemplo como método indireto de avaliação da eficácia de fasciolicidas. De entre os testes de imunodiagnóstico disponíveis, destaca-se o teste imunoenzimático indireto (ELISA), que é indicado para estudos epidemiológicos (BOSSAERT *et al.*, 2000).

Técnicas de diagnóstico não-invasivas, como o exame radiológico, exames de ultrassonografia também são utilizadas e são eficientes em lesões patológicas secundárias. A tomografia computadorizada tem um alto grau de resolução para auxiliar no diagnóstico patológico de infeção.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) tem vindo a ser utilizada para a identificação de *Fasciola* spp., tornando possível determinar marcadores para diagnóstico de resistência (FAIRWEATHER, 2005).

1.6. Prevenção e controlo

A eficiência do controlo da fasciolose resulta da integração de medidas, tais como, a redução das infeções nos hospedeiros definitivos, através do uso de compostos fasciolicidas; a redução da população dos moluscos do género *Lymnaea*, hospedeiros intermediários, através de métodos químicos, físicos e biológicos; e, evitar o contacto hospedeiro-parasita através do manejo (MÜLLER, *et al.*, 2003).

Pelo alto poder biótico dos moluscos hospedeiros, a sua erradicação é praticamente impossível. O meio mais eficiente para a redução das populações de

moluscos é a drenagem, que, no entanto, nem sempre é possível devido à extensão das áreas contaminadas e mesmo porque, em alguns casos, essas áreas consistem nos próprios canais de irrigação da lavoura agrícola. O isolamento, por cercas, dos habitats naturais é uma outra alternativa que poderia ser adotada quando essas áreas representassem uma pequena porção da propriedade. Uma medida para limitar a população de caracóis é a criação de aves aquáticas, predadores naturais (ECHEVARRIA, 2004). A redução da população de hospedeiros intermediários, ou seja, o combate aos moluscos tem sido feita com métodos químicos, físicos e biológicos (MÜLLER, *et al.*, 2003).

1.7. Tratamento e resistência

O albendazol (ABZ) é um fármaco de amplo espectro de ação, tendo ampla atuação em várias espécies de helmintos, atua em tremátodes na fase adulta. Metronidazol e albendazol e esporadicamente também mebendazol têm sido também aplicados com maior ou menor sucesso. Os membros do grupo Fasciolidae são os únicos tremátodes que têm praticamente nenhuma resposta ao praziquantel. Triclabendazol (TCBZ) é o fármaco de escolha no presente (SAVIOLI *et al.*, 1999) e é reconhecido como o mais efetivo fasciolicida, por possuir ação antiparasitária sobre os três estágios de desenvolvimento de *Fasciola* spp., sendo recomendado para o controle de surtos de fasciolose (RADOSTISTS *et al.*, 2002). O triclabendazol pertence à família dos benzimidazóis e atua seletivamente na beta-tubulina, despolarizando os microtúbulos, e causando perda de suas funções em helmintas (ROBINSON *et al.*, 2001). No que diz respeito às mudanças no local de ação do fármaco, o alvo presumido no parasita é o gene da beta-tubulina (OUELLETTE, 2001). O fato da beta-tubulina estar presente, não limita a possibilidade de que outro tipo de tubulina exista, e que possua introns importantes ou ainda proteínas que atuem conjuntamente no mecanismo de resistência (ROBINSON *et al.*, 2001).

Infelizmente, a resistência ao triclabendazol foi já descrita na Austrália, Irlanda, Escócia, Holanda e Espanha, Brasil, Argentina e também no Peru (ASHRAFI *et al.*, 2014; FAIRWEATHER, 2005). Este é preocupante uma vez que a incidência da fasciolose tende a aumentar.

Uma forma de resistência a anti-helmínticos, e específica dos benzamidazóis, é a mimetização da beta-tubulina do hospedeiro pelo parasita: em parasitas sem resistência, a beta-tubulina é diferente da beta-tubulina humana, por isso o fármaco pode selecionar a beta-tubulina do parasita; porém, quando ocorre a troca de fenilalanina por tirosina na posição 200, as duas beta-tubulina (humana e do parasita) ficam muito semelhantes, fazendo com que o fármaco deixe de conseguir atuar no parasita (LEWIS *et al.*, 1985).

1.8. Diversidade genética de *Fasciola hepatica*

Desde a descoberta da estrutura molecular do DNA, por James Watson e Francis Crick em 1953, o campo da genética tem progredido consideravelmente e contribuído para a compreensão de processos biológicos inerentes à evolução de espécies. Com o advento das técnicas de biologia molecular, tornou-se possível a manipulação do ácido desoxirribonucleico (DNA), culminando com o surgimento dos marcadores moleculares na década de 1980. Desde então, esses marcadores têm acompanhado os avanços da era genômica, beneficiando-se do grande volume de informações de sequências de DNA disponível. Ao longo dos últimos 30 anos, a genética molecular vem inovando o campo das ciências biológicas, possibilitando o desenvolvimento de métodos para caracterizar geneticamente indivíduos e populações (FREELAND, 2005; GUIMARÃES *et al.*, 2009; TENEVA, 2009).

Genes de DNA mitocondrial e nuclear (principalmente os genes que codificam RNA ribossomal) têm sido utilizados como marcadores em genética de populações e para a classificação da filogenia de Fasciolidae (ZAROWIECKI *et al.*, 2007).

Para além disso, uma variedade de métodos moleculares têm sido aplicados no estudo e caracterização desses marcadores e para estruturação genética de populações de parasitas, incluindo *Fasciola*. Exemplos de tais métodos são: PCR - RFLP, a amplificação aleatória de DNA (RAPD), sequenciação, etc. Cada método tem limitações que variam entre eles, mas incluem o requer muito tempo, trabalho e custos, serem de interpretação difícil e, baixa reprodutibilidade. A caracterização direta de polimorfismos de nucleótido único (SNP), normalmente através de sequenciação, tem sido um dos métodos mais confiáveis usado em estudos de diversidade genética de *F. hepatica*. As informações sobre essas variações poderiam aumentar o conhecimento

relativamente a espécie, diferenciação e diversidade de espécies estreitamente relacionadas e relações intraespecíficas (TEOFANOVA *et al.*, 2012).

A maioria das técnicas de biologia molecular utilizados para a investigação taxonómica, filogenética e evolutiva de espécies do género *Fasciola* baseia-se no método convencional de reação em cadeia da polimerase (PCR). O método de PCR é amplamente utilizado em análise genómica e vários métodos baseados em PCR estão disponíveis variando em complexidade, fiabilidade e capacidade de gerar informação, tendo cada sistema tem suas próprias vantagens e desvantagens, como referido anteriormente (TEOFANOVA *et al.*, 2012).

Alguns dos estudos de polimorfismos genéticos mais frequentemente realizados envolvem a análise da frequência de polimorfismos de nucleótido único (Single Nucleotide Polymorphism - SNP), onde uma única base nitrogenada do DNA é substituída por outra (NUSSBAUM *et al.*, 2002). Segundo Kubistova *et al.*, (2009) estas variações estão normalmente associadas à diversidade populacional, individualidade, suscetibilidade a doenças e resposta individual a medicamentos. Dentro de uma população, a frequência de um alelo pode ser atribuída à relação entre os SNPs que a população carrega, sendo a variante mais comum presente em maior frequência do que as variantes raras.

Os polimorfismos de base única são menos mutáveis, o que faz deles marcadores estáveis, sendo excelentes para estudo de características genéticas complexas e para entendimento da evolução genómica. Logo, são marcadores adequados e mais fáceis de suceder em estudos populacionais (JEHAN E LAKHANPAUL, 2006).

Os SNPs são as bases genéticas da maioria das variações alélicas e podem ser tratados como marcadores bialélicos, possuindo amplas aplicações no mapeamento genético de alta resolução e em testes diagnósticos (USECHE *et al.*, 2001) **Cit.** por (GUIMARÃES *et al.*, 2009). Por serem marcadores bialélicos, SNPs são menos polimórficos que microssatélites, mas SNPs são as fontes de variação genética mais comuns e, conseqüentemente, representam uma porção substancial no número de loci disponíveis para diversas espécies (BRUMFIELD *et al.*, 2003).

O modo de herança genética difere entre marcadores moleculares de DNA nuclear (nDNA) e de DNA mitocondrial (mtDNA). Marcadores de nDNA (ex.: ITS, 18S, 28S) possuem herança biparental, são muito utilizados em reconstrução

filogenética de diversos taxons e podem, eventualmente, ser usados para detectar hibridização de espécies (FREELAND, 2005; GROSS, NILSSON & SCHMITZ, 1996). Já os marcadores de mtDNA (ex.: COI, Cytb, ND4) possuem, na vasta maioria dos casos, herança uniparental e são amplamente utilizados em estudos populacionais, pois muitos apresentam amplo polimorfismo intraespecífico e evoluem mais rapidamente que marcadores em nDNA (AVISE, 2000).

Os genes para RNA ribossomal (RNAr) estão organizados em unidades repetidas em tandem (Figura 8). São genes bastante conservados e muito utilizados em estudos de eucariotas.

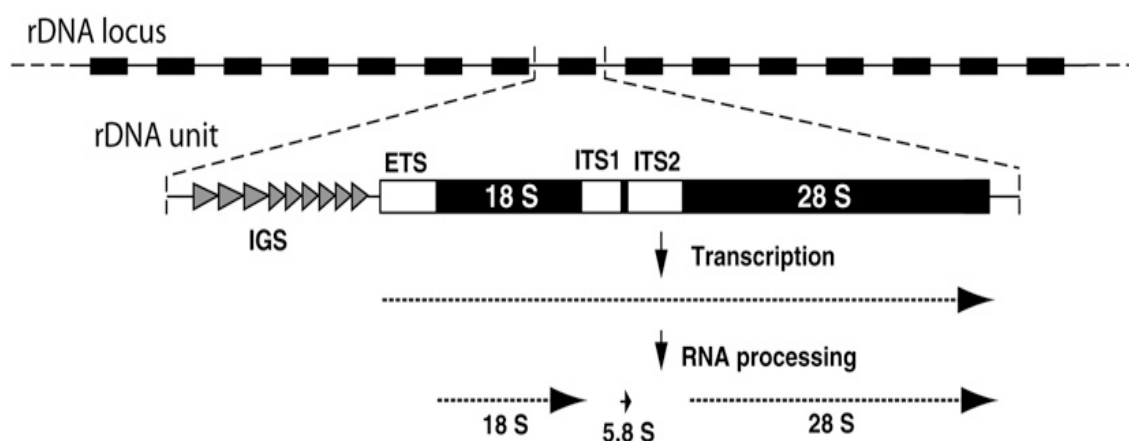


Figura 8: Organização dos genes para RNA ribossomal (RNAr) em eucariotas. ETS: espaçador transcrito externo; ITS: espaçador transcrito interno e IGS: espaçador intergênico. Fonte: Eickbush e Eickbush, (2007).

Para além das regiões codificantes, as regiões intergênicas ITS-1, ITS-2 têm sido amplamente utilizadas na caracterização molecular do género *Fasciola* e no estabelecimento da sua diversidade genética intra e interespecífica (MAS-COMA *et al.*, 2001), visto serem mais polimórficas do que as regiões codificantes. A comparação de sequências destas regiões tem sido uma abordagem confiável para estudo molecular sistemática da maioria dos helmintas parasitas (GASSER, 1999).

Os genomas mitocondriais e seus genes têm sido também amplamente utilizados em estudos sobre a evolução animal, filogenia, biogeografia, sistemática, genética de populações e áreas afins. A sequência completa do DNA mitocondrial de *F. hepatica* foi determinada e compreende 14462 pb, e 12 genes codificantes de proteínas, 2

ribossomais e 22 genes para RNA de transferência (LE *et al.*, 2000; LE *et al.*, 2001) Cit. por (THANH, 2012).

O gene para a subunidade I de citocromo c oxidase (COI) é tem sido muito utilizado na identificação de espécies, devido à sua diversidade, ter um pequeno tamanho (cerca de 650 pb) e facilidade em ser alinhado (BUENO-SILVA 2012).

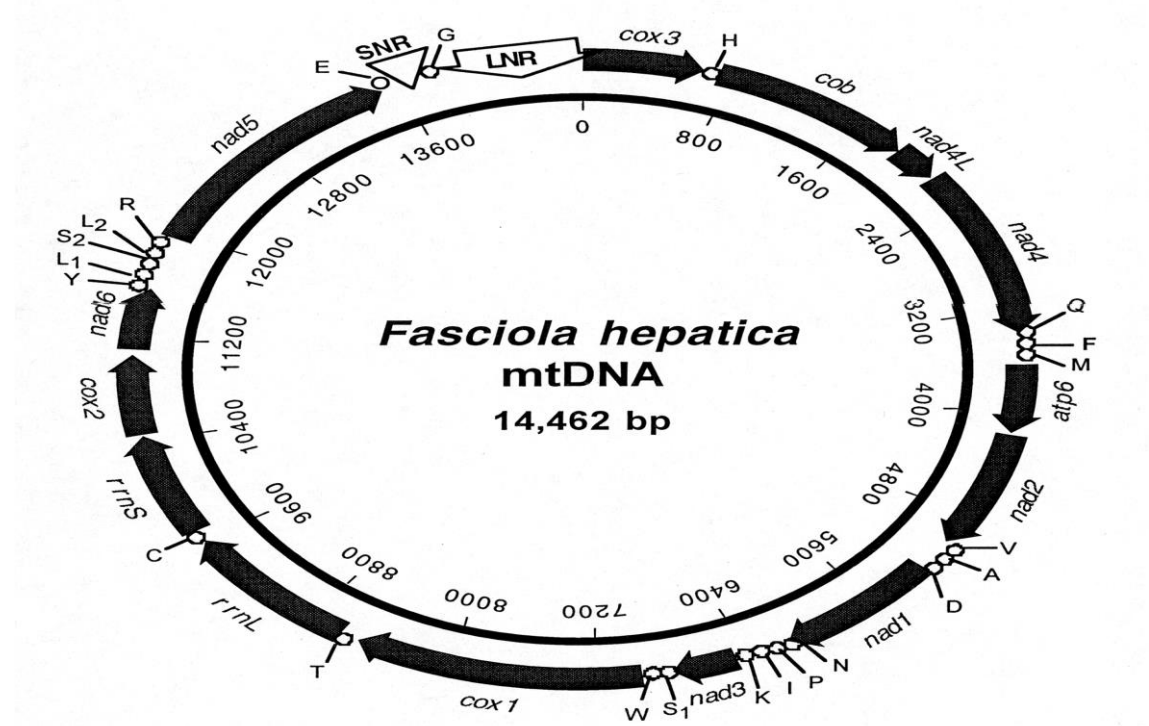


Figura 9: Estrutura do genoma mitocondrial de *F. hepatica* Fonte: (Le, 2001) Cit. por (THANH, 2012).

A tubulina é uma proteína constituinte dos microtúbulos, fazendo parte do tegumento de *Fasciola* sp., e alvo de ação de anti-helmínticos. Existe um modelo da estrutura em 3D desta proteína. Seis aminoácidos parecem estar associados a resistência a anti-helmínticos (CHAMBERS, 2010), mas as poucas sequências disponíveis nas bases de dados não contêm o consenso total destes aminoácidos.

Um recente estudo analisou a variação em diversidade entre três regiões da Europa de leste, norte e sul, para marcadores mitocondriais (COIII, tRNA His, CytB) e nucleares (TubB3, 28S), mostrando haver diferenças entre os países a norte e sul (TEOFANOVA *et al.*, 2011). Encontrou-se também heterozigotia a nível de marcadores

nucleares, sugestivos de cruzamentos entre parasitas, o que tem implicações na proliferação em populações de resistência emergente a anti-helmínticos.

O grau de heterogeneidade genética intraespecífica é geralmente considerada uma medida da capacidade de adaptação e resiliência de uma espécie de parasita, incluindo a sua capacidade de desenvolver resistência aos medicamentos (WALKER *et al.*, 2007, 2011).

Será importante determinar e comparar a diversidade de *F. hepatica* em Portugal em relação a outros países, incluindo na Europa. Em 2012, um estudo já tinha sido realizado sobre a variabilidade genética de *F. hepatica*, em diferentes hospedeiros (bovinos e ovinos) e localizações geográficas de Portugal. Foram analisados polimorfismos de DNA amplificado ao acaso-reação em cadeia da polimerase (RAPD-PCR), polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) e sequências dos genes codificantes da subunidade I da desidrogenase NADH (nad1), da subunidade I do citocromo c oxidase (COI) e dos espaçadores internos transcritos ribossomais (ITS1 e 2). Os padrões de RAPD-PCR e de RFLP foram indistinguíveis em todas as amostras analisadas, independentemente do hospedeiro e da região de origem (SANTOS, 2012). A sequenciação nucleotídica revelou baixos níveis de diversidade genética e não foi observada nenhuma correlação entre o haplótipo e a localização geográfica ou o hospedeiro (SANTOS, 2012).

O conhecimento da estrutura genética de populações de *F. hepatica* é essencial quando se avalia o potencial de desenvolvimento e extensão da resistência aos anti-helmínticos, tais como fármacos TCBZ e ABZ.

1.9. Objetivos

Analisar a diversidade genética de *F. hepatica* em Portugal, em relação ao leste da Europa, e no Brasil, através de PCR convencional e de um novo PCR específico para alelos, e baseado no espaçador transcrito interno 1 (ITS1) ribossomal e nos genes para citocromo c oxidase sub-unidade I (COI), 28S e beta-tubulina 3 (TubB3).

Especificamente, pretendeu-se:

- Sequenciar ITS1 e COI para comparar a frequência de polimorfismos sinónimos e não sinónimos nas diferentes populações;

- Desenvolver PCR específico para SNPs de interesse nos genes para beta tubulina 3 (TubB3) e 28S, para genotipagem de amostras de *F. hepatica* de Portugal e do Brasil;
- Determinar a presença de possíveis codões para aminoácidos associados a resistência a anti-helmínticos em tubulina-beta 3.

Capítulo 2 - Material e Métodos

2. Material e Métodos

2.1. Amostra

Utilizou-se uma amostra com um total de 94 vermes adultos de *F. hepatica* da coleção do Departamento de Helminologia Médica do IHMT, fixadas em etanol a 70% e armazenadas a -20 °C, com os respectivos códigos e datas (Anexo 1). As amostras Portuguesas (87) tinham sido obtidas entre 2009 e 2010, de matadouros (Castelo Branco, Setúbal, Pedrogão Grande e Leiria), de ovinos e bovinos. As amostras brasileiras (7 amostras) tinham sido recolhidas em 2015 de bovinos da região de Espírito Santo, Brasil (Figura 10).



Figura 10. Mapa do Brasil; Leste da América do Sul, indicando a região da proveniência das amostras (Espírito Santo).

As amostras brasileiras foram gentilmente cedidas pela estudante de doutoramento Samira D'Almeida.

2.2. Extração e quantificação de DNA

A extração do DNA genómico foi realizada utilizando o protocolo de extração com CTAB segundo (STOTHARD *et al.*, 1996) modificado. Uma pequena porção do lado posterior do verme foi macerada juntamente com 100µl de tampão CTAB em microtubo de 1,5 ml, em seguida foi adicionado e homogenizado com 500 µl de CTAB e 3 µl de proteinase K. A amostra com as soluções foram mantidas a 56°C por 90 minutos com agitação (ou a 37°C durante a noite), em seguida foi adicionado o mesmo volume (600 µl) de clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e agitado por inversão durante 2min, seguidamente centrifugado por 20 min a 13000rpm; Retirado o sobrenadante, colocado em outro microtubo novo de 1,5 ml, neste foi adicionado 2.5x de volume (800 µl) do sobrenadante de etanol gelado. O DNA foi incubado a -20°C por 30min-1 hora, em seguida deixado estabilizar à temperatura ambiente e centrifugado à 13000rpm por 20min; o precipitado foi lavado com álcool 70% (Adicionado ao pellet 100-500µl de etanol 70%; centrifugado a 13000 rpm por 15 min; Retirado o sobrenadante; Colocado o tubo aberto a 60°C no máximo 15min); Adicionado 100µl de água mQ. Após a extração, o DNA foi avaliado quanto à quantidade (ng/µl) e à qualidade (razão das absorbâncias A260/A280) em em espectrofotómetro (NanoDrop ND-1000).

2.3. Amplificação por PCR

Para estudo da diversidade genética de *Fasciola hepatica* em Portugal, amplificaram-se quatro regiões genómicas por PCR, com os *primers* descritos na Tabela 2: a região intergénica ribossomal ITS1 (BOWLES & MCMANUS, 1992), o gene mitocondrial COI (BOWLES & MCMANUS, 1993), a região 3 do gene para beta-tubulina (TEOFANOVA *et al.*, 2011) e a região ribossomal 28S (TEOFANOVA *et al.*, 2011).

Todas as reações de PCR foram realizadas em volumes de 20 µl, com: 1 µl de DNA genómico (5-100 ng/µl), 1 µl de cada iniciador (*primer*; 10 pmol/µl), 2 µl de dNTPs (1mM), 1 µl de MgCl₂ (50mM), tampão na concentração recomendada pelo fabricante e 0,2 µl de polimerase *Taq* (Bioline ou Promega). Foi usado dimetilsulfóxido (DMSO) a 5%, para melhorar a especificidade da reação de PCR quando necessário.

O perfil de amplificação foi: 95 °C por 5 min, seguido de 37 ciclos incluindo denaturação a 95 °C durante 1 min, Annealing (junção) a 60 °C durante 1min e extensão a 72 ° C durante 1,5 min, com uma extensão final a 72 °C durante 10 min. Os produtos de PCR (10µl) foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1%, em seguida corados com brometo de etídio (diluição: 10µl de brometo de etídio [10mg/ml] em 100ml de água destilada) e visualizados em transluminador, em comparação com 5µl de marcador molecular HyperLadder™ 50bp (Bioline).

2.4. Amplificação específica para alelos por PCR (SNPs)

A otimização da reação teve-se em conta o acréscimo ou não do DMSO, o perfil de temperatura e o tempo de extensão nos 37 ciclos do termociclador.

Segundo Drenkard, *et al.*, (2000) **Cit.** por (LIU *et al.*, 2012) para facilitar a discriminação fiável entre dois alelos altamente, a adição de desemparelhamentos artificiais dentro das três bases da extremidade 3' dos *primers* pode ser benéfico.

Primers de alelo específicos correspondentes aos SNP foram projetados de acordo com diferentes combinações entre base de incompatibilidade e local incompatibilidade (Tabela 2).

Tabela 1:

Primers utilizados para a amplificação por PCR.

Alvo	Tamanho do fragmento	Nome	Sequência (5'-3')
TubB3	836 pb	BT3aF	CCCGGACAATTTTGTTTTTCGGTCA
		BT3aR	CGTTGGTTCGGAATCCACTCGACAAA
28S	618 pb	28S-F	AGCTGATTACCCGCTGAACT
		28S-R	CTGAGAAAGTGCACTGACAAG
ITS1	400pb	BD1	GTCGTAACAAGGTTTCCGTA
		4S	TCTAGATGCGTTCGAA(G/A)TGTCGATG
COI	460pb	JB3	TTTTTTGGGCATCCTGAGGTTTAT
		JB 4.5	TAAAGAAAGAACATAATGAAAATG

Tabela 2:

Primers utilizados para a amplificação por PCR de alelos.

Alvo	Nome	Sequência
beta-tubulina 3 SNP: A311 ((Gly/Glu)104)	BT3aF-311-t2G	GAGCGGTGCGGGAAACAACCTGGGCCAtG
	BT3aF-311-t2A	GAGCGGTGCGGGAAACAACCTGGGCCAtA
	BT3aF-311-t3G	GAGCGGTGCGGGAAACAACCTGGGCCtAG
	BT3aF-311-t3A	GAGCGGTGCGGGAAACAACCTGGGCCtAA
28S SNP: 105	28SF-105-t2G	AGTAACGGCGAGTGAACAGGGAgG
	28SF-105-t2A	AGTAACGGCGAGTGAACAGGGAgA
	28SF-105-t3G	AGTAACGGCGAGTGAACAGGGgAG
	28SF-105-t3A	AGTAACGGCGAGTGAACAGGGgAA

2.5. Sequenciação de DNA

Alguns produtos de PCR foram sequenciados utilizando os mesmos *primers* que tinham sido utilizados em PCR. Utilizou-se 10 µl do produto de PCR, sem purificação, entre 25 a 100ng/µl, determinado por comparação em eletroforese de gel de agarose com marcadores de peso e concentração conhecidos (HyperLadder™ 50bp, Bioline), a que se juntou 3µl de cada *primer* (10 pmol/µl, na empresa STAB VIDA - Inv. e Serv. Ciências Biológicas, Lda, Portugal (www.stabvida.com)).

2.6. Análise de sequências

As sequências obtidas foram verificadas e editadas no programa ChromasLite 2.1.1. (Technelysium). Utilizando a ferramenta online BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) foi feita a comparação de cada sequência com as disponíveis no banco de dados GenBank do NCBI. As sequências disponíveis no GenBank foram incluídas nos alinhamentos finais de comparação com as sequências obtidas. As sequências obtidas neste projeto foram montadas para obter uma sequência consenso e todas foram alinhadas no programa BioEdit.

Os alinhamentos foram utilizados para produzir árvores filogenéticas com o algoritmo Neighbor-Joining e as distâncias calculadas através do modelo que se melhor ajustava aos dados, no programa MEGA7.0.20 (KUMAR *et al.*, 2016). Redes

filogenéticas foram geradas, para alinhamentos de sequências com bases ambíguas ou heterozigóticas, no programa SplitsTree4, utilizando o algoritmo NeighborNet e as distâncias calculadas através do modelo Kimura-2- parameter.

2.7. Análise populacional

Estimou-se, para o marcador nuclear 28S, posição 105, em que se obteve dados para 7 ou mais indivíduos, se as frequências genotípicas nas amostras da população Portuguesa e Brasileira estariam ou não distribuídas de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg, através da ferramenta online " Hardy-Weinberg equilibrium calculator including analysis for ascertainment bias" (<http://www.oege.org/software/hwe-mr-calc.shtml>) para marcadores bialélicos. Valores de $p < 0.05$ correspondem a um desvio estatisticamente significativo em relação às frequências genotípicas esperadas a partir das frequências alélicas observadas na amostra.

Capítulo 3 - Resultados

3. Resultados

3.1. Avaliação de DNA extraído

Obteve-se DNA purificado de um total de 94 amostras de vermes adultos de *F. hepatica*, 7 de origem brasileira e 87 de origem portuguesa; como descrito no item Material e métodos, seguindo o protocolo com CTAB. As concentrações de DNA obtidas variaram entre 26 ng/μl e 1774 ng/μl, com um valor médio de 833,23ng/μl; os valores do grau de pureza variaram entre 1,3 e 2,15, com um valor médio de 1,9 (anexo 2).

3.2. PCR específico para alelos

Pretendeu-se, neste trabalho, comparar a diversidade de populações de *F. hepatica*, para três marcadores genômicos, com três países do leste Europeu (TEOFANOVA *et al.*, 2011). Para além disso, desenvolveu-se e investigou-se a utilidade de métodos de PCR específicos para SNPs de interesse, especificamente para dois genes nucleares, 28S rDNA e beta-tubulina 3 (tubB3).

Primers foram desenhados a partir de alinhamentos das sequências disponíveis para sítios polimórficos escolhidos dos genes para tubB3 e para 28S (tabela 2).

Para aumentar a especificidade, foram introduzidas bases não complementares nas sequências dos *primers* para gerar desemparelhamento de pares de bases na 2^a e 3^a posições em relação ao extremo 3'. Entre os desemparelhamentos nas segundas e terceira posições, não houve diferenças significativas para o gene 28S, ao passo que para beta-tubulina 3 notou-se pouca eficiência dos *primers*, mas melhores resultados para os *primers* com desemparelhamento na segunda posição (figura 16).

Na otimização de PCR verificou-se melhores resultados com adição de 5% DMSO, que melhorou a especificidade da reação, e um perfil de temperatura a 60°C e tempo de extensão de 1 minuto nos 37 ciclos do termociclador (figuras 11 e 12).

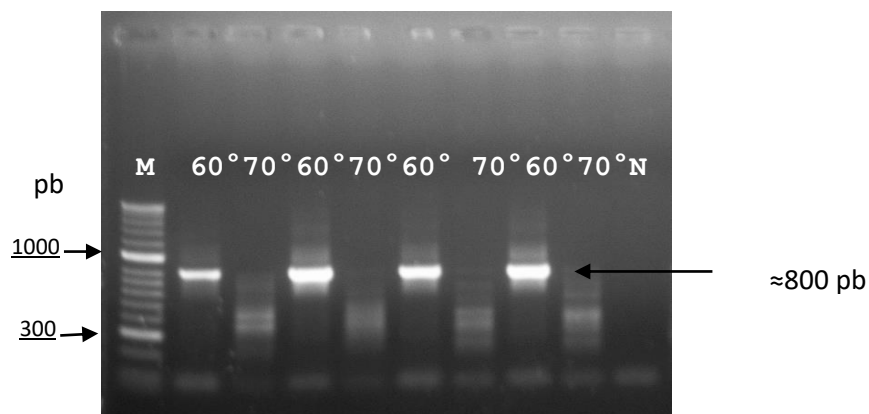


Figura 11: Resultados de PCR para otimização da temperatura, com *primers* para alelos específicos que amplificam um fragmento de aproximadamente 836 pb da região beta-tubulina 3 de *F. hepatica* para o SNP BT3-311-t2G/BTaR. Com 5% DMSO. M: marcador. N: Controlo negativo. 60 e 70 °C respectivamente.

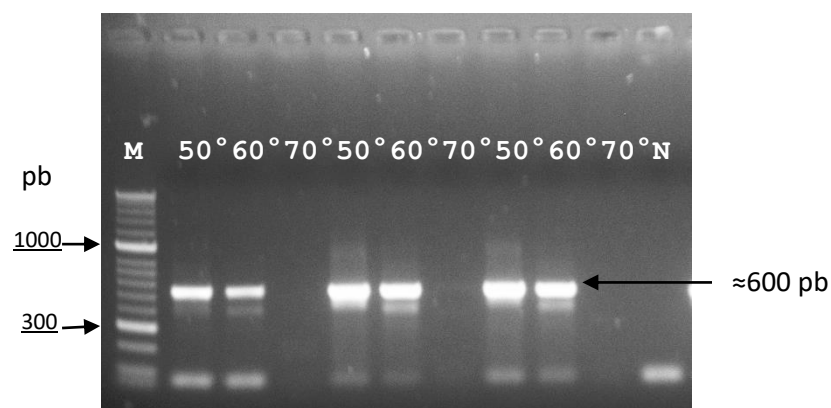


Figura 12: Resultados de PCR para otimização da temperatura, com *primers* para alelos específicos que amplificam um fragmento de aproximadamente 600 pb da região 28S rDNA de *F. hepatica* para o SNP 28SF-105-t2G/28S-R. Com 5% DMSO. M: marcador. N: Controlo negativo. 50, 60 e 70 °C respectivamente.

3.3. ITS1

Amplificou-se a região ITS1 para 20 amostras (Figura 13), cujos produtos foram sequenciados. Não se registaram polimorfismos nas sequências Portuguesas (anexo 3), mas confirmou a identidade das amostras como *F. hepatica*.

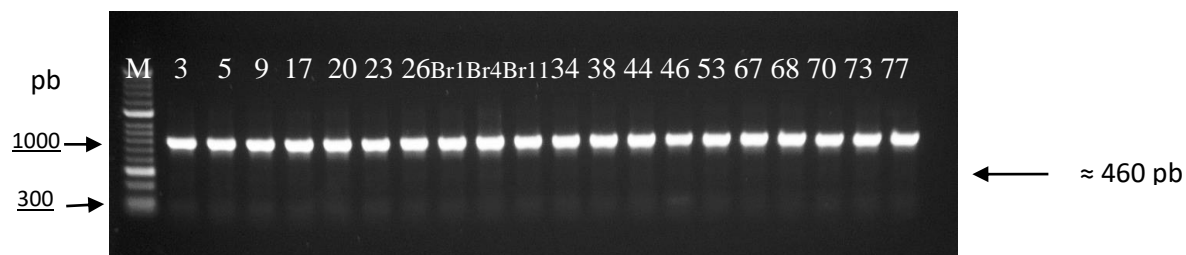


Figura 13: Resultados de PCR com “*Primers*” BD1/4S que amplificam um fragmento de aproximadamente 400pb da região ITS1 de *F. hepatica*. M: marcador

3.4. COI

As sequências de COI obtidas neste trabalho foram comparadas e alinhadas com outras depositadas em bases de dados no programa BioEdit (Anexo 4), registrando-se 7 posições polimórficas (Tabela 3). Cinco destas posições eram também polimórficas noutras sequências de amostras não Portuguesas, mas três representam novos polimorfismos (T3, na amostra 17, e C177, na amostra 3), sendo que um, C21, apenas aparece em sequências de *F. gigantea*. Na análise filogenética, usando o programa SplitsTree para produzir uma rede com o algoritmo NeighborNet, as amostras obtidas em Portugal e Brasil apresentavam diversas origens (Figura 15).

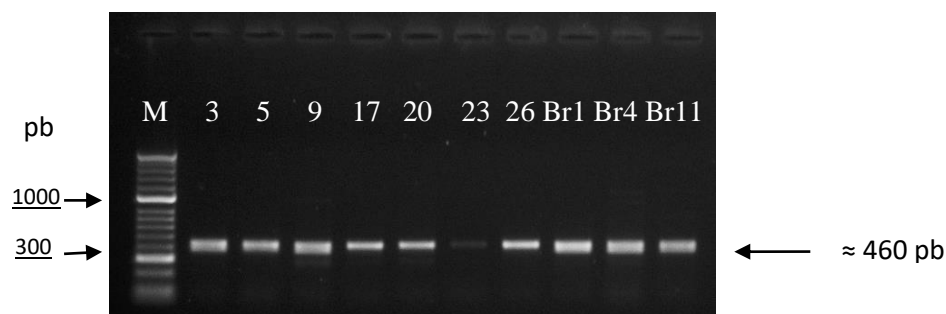


Figura 14: Resultados de PCR com “*Primers*” JB3/JB4,5 que amplificam um fragmento de aproximadamente 460 pb da região COI de *F. hepatica*. M: marcador

Tabela 3. Polimorfismos detetados no produto de PCR de COI em amostras Portuguesas e Brasileiras.

AMOSTRA	T3	T21	T31	T139	T140	C177	G198
3	T	T	T	T	T	C	G
5	T	TC	C	TC	AT	T	G
9	T	T	C	TC	T	T	G
17	TA	TC	C	TC	AT	T	G
20	A	T	C	TC	AT	T	G
23	T	T	C	T	T	T	G
26	T	T	C	TC	AT	T	G
Br1	T	T	C	TC	A	T	A
Br4/Br11	T	T	C	TC	AT	T	G
Frequência							
em Portugal	A:3/14	C: 2/14	T: 2/14	C: 5/14	A: 4/14	C: 2/14	

Nota: posições dos polimorfismos em relação aos alinhamentos do Anexo 3.

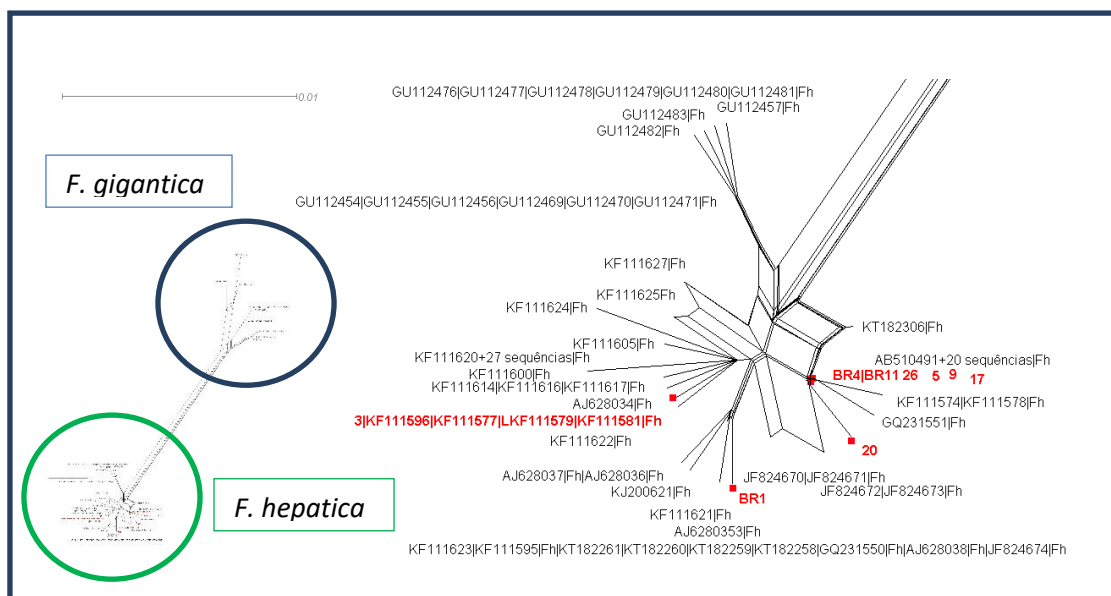


Figura 15. Rede filogenética com base em sequências de COI obtidas através do programa SplitsTree4, com distâncias calculadas através do coeficiente de Kimura-2-parameter, e de acordo com o algoritmo NeighborNet. Na imagem principal, as sequências de amostras de *F. hepatica*, com a rede completa à esquerda. A vermelho estão as sequências determinadas neste trabalho. Algumas sequências são comuns a várias amostras no GenBank, como segue: AB510491+20 sequências|Fh: AB510491, KF111618, KF111615, KF111629, KF111590, KF111585, KF111587, KF111626, GQ121276, KT182304, KT182303, KT182302, KT182301, KT182300, KT182299, KT182298, KT182297, KT182296, GQ231549, GQ231548, AJ628039; KF111620+27 sequências|Fh: KF111620, KF111603, KF111607, KF111612, KF111613, KF111601, KF111599, KF111598, KF111597, KF111594, KF111593, KF111591, KF111589, KF111592, KF111586, KF111584, KF111580, KF111582, KF111588, KF111611, KF111628, KF111576, KF111606, KF111608, KF111609, KF111610, KF111619, KF111575|Fh; GU112458+9 sequências|Fg: GU112458, GU112459, GU112460, GU112461, GU112462, GU112463, GU112465, GU112466, GU112467, GU112468|Fg; KT182295+13 sequências|Fg: KT182295, KT182288, KT182287, KT182286, KT182285, KT182284, KT182283, KT182282, KT182281, KT182280, KT182279, KT182278, KT182277, KT182276|Fg; KT182294+6 sequências|Fg: KT182294, KT182293, KT182292, KT182291, KT182290, KT182289, KT182308|Fg

3.5. 28S

Através da amplificação com *primers* específicos para os alelos 105G e 105A de 28S, verificou-se que quase todas as amostras eram bialélicas (figura 16). O teste de Qui-quadrado para o equilíbrio de Hardy-Weinberg apresentou uma diferença estatisticamente significativa entre as frequências genotípicas esperadas e observadas na amostra Portuguesa, sendo $p < 0,001$, e na amostra Brasileira, com $p < 0,01$, com excesso de heterozigotos nas duas.

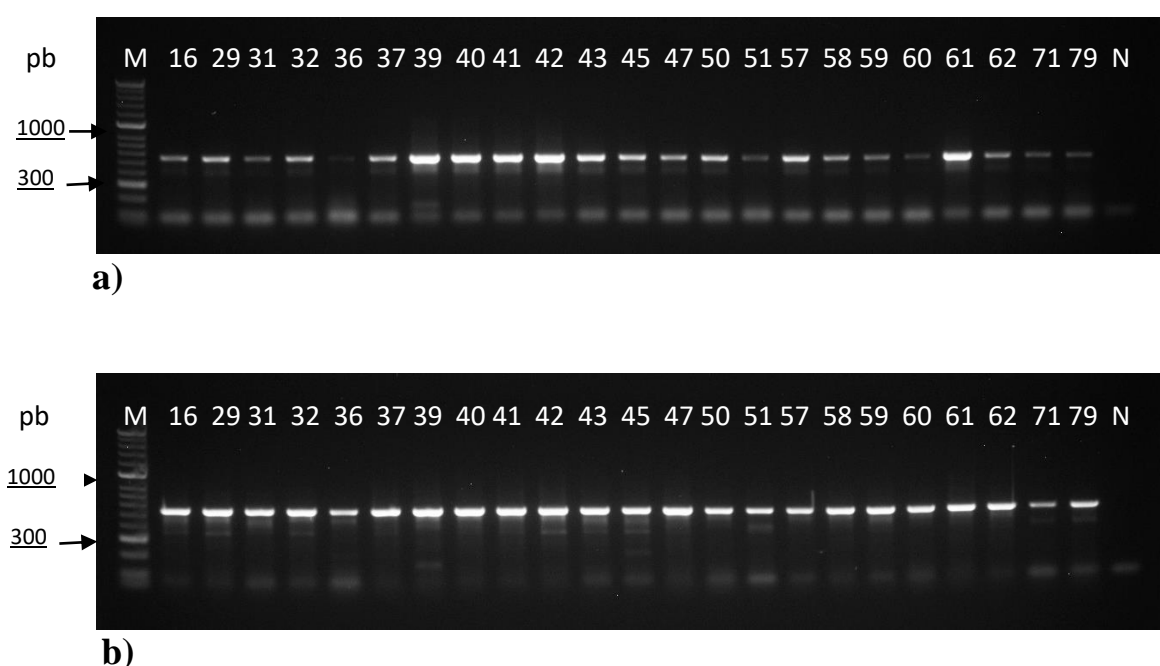


Figura 16: Produtos de PCR das amostras aleatórias, com *primers* para alelos específicos que amplificam um fragmento de 600 pb da região 28S rDNA de *F. hepatica*, para *respetivamente* o SNP: a) G (*primers* 28SF-105-t2G/28S-R) e b) A (*primers* 28SF-105-t2A/28S-R). Com 5% DMSO. M: marcador. N: Controlo negativo.

Todas as 94 amostras eram heterozigóticas para a posição 105 de 28S.

O produto completo de PCR de 28S para a amostra 3 foi sequenciado com os mesmos *primers* que tinham sido utilizados para amplificação, tendo-se confirmado o genótipo heterozigótico detetado por PCR específico (Figura 17 e Anexo 5, posição 40). A sequência da amostra 3 é indistinguível da sequência HM369353, amostra pol78 originária da Polónia, e a única na base de dados com esta heterozigotia. A análise

filogenética indica que estas os dois alelos pertencerão a duas linhagens próximas de *F. hepatica* (Figura 18). De notar que a sequência HM369355 apresenta outra posição heterozigótica (Anexo 5).

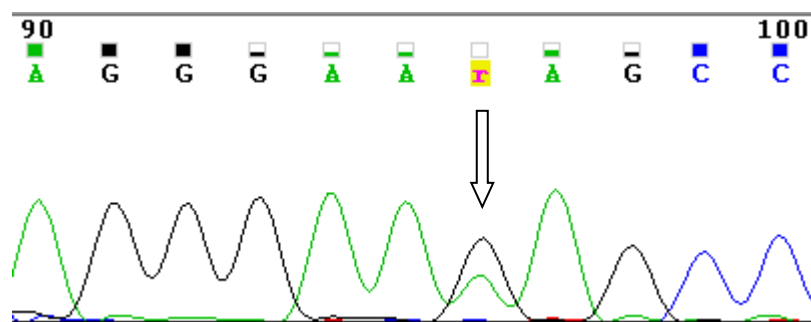


Figura 17: Fragmento de sequenciação do produto de amplificação por PCR de 28S, mostrando o locus bialélico (A/G: r).

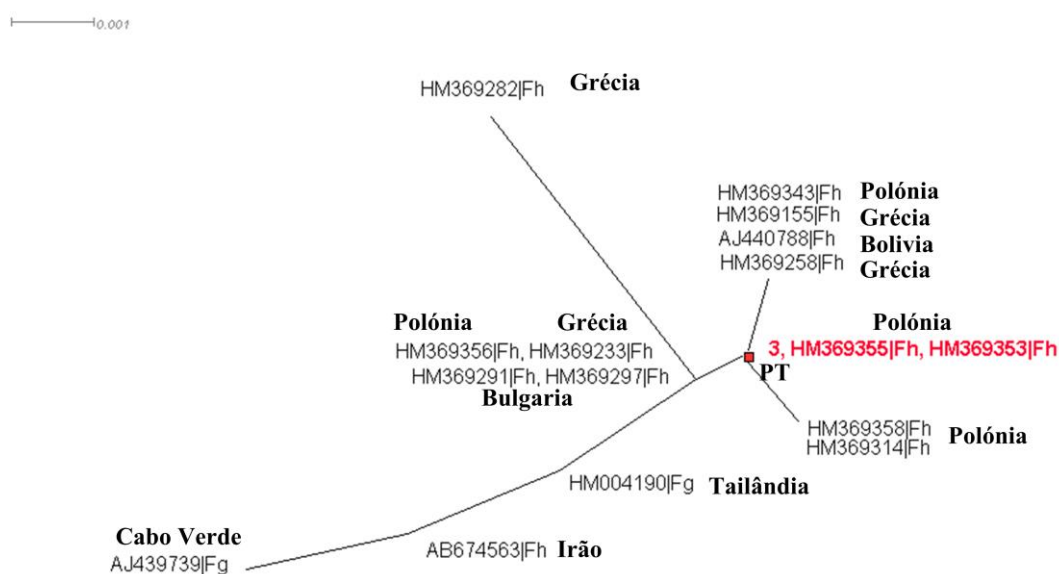
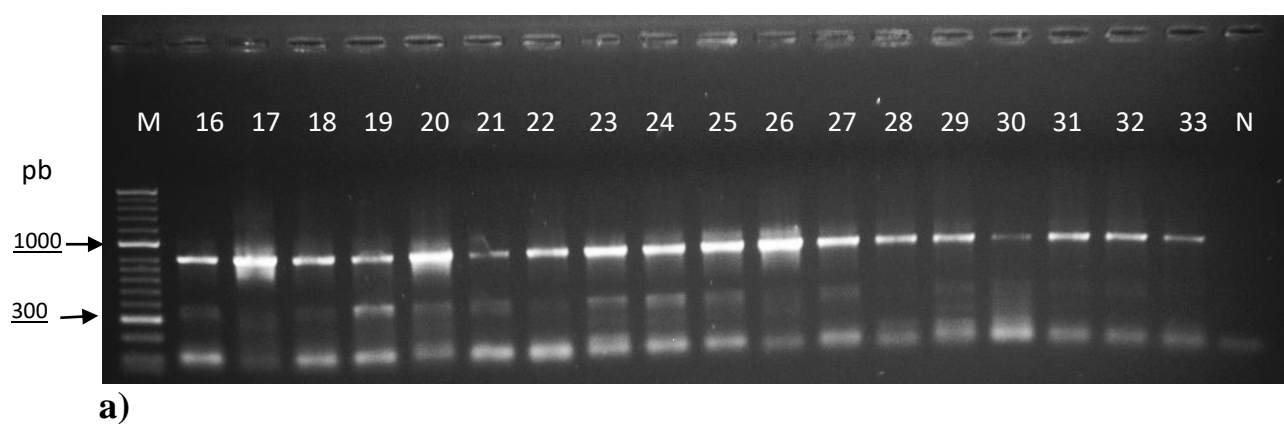


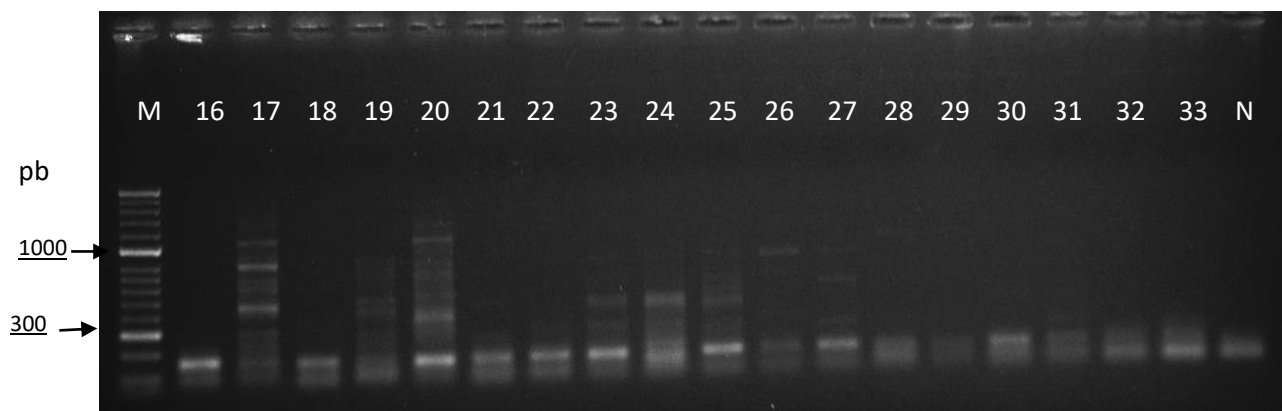
Figura 18: Rede filogenética com base em sequências de 28S obtida através do programa SplitsTree4, com distâncias calculadas através do coeficiente de Kimura-2-parameter, e de acordo com o algoritmo NeighborNet. A vermelho estão as sequências determinadas neste trabalho. Fg é *F. gigantica* e Fh é *F. hepatica*.

3.6. Beta-tubulina 3

Através da amplificação com *primers* específicos para os alelos 311G e 311A de tubB3, verificou-se que todas as amostras Portuguesas e Brasileiras apenas possuíam o alelo G (figura 19 e anexo 6), e, portanto, não havia alteração do amino ácido. O produto completo de PCR de tubB3 para as amostras 3 e 38 foi sequenciado com os mesmos *primers* que tinham sido utilizados para amplificação, tendo-se confirmado o genótipo homozigótico detetado por PCR específico (Tabela 4 e Anexo 6). Contudo, várias outras posições apresentaram heterozigotia (Tabela 4) nestas duas amostras e que não têm correspondência noutras sequências (Anexo 6). Várias destas posições heterozigóticas estavam localizadas no intrão deste gene e não têm portanto efeito na sequência da proteína. Nenhum dos polimorfismos registados nos exões alterava a sequência proteica. De notar que os posições polimórficas como indicadas no artigo de TEOFANOVA *et al.*, (2011) não foram encontradas neste trabalho, sendo a posição 311 na realidade 309 neste trabalho, como confirmado por análise das sequências depositadas em base de dados. A análise filogenética (Figura 20) sugere que ambas as sequências apresentam alelos de linhagens próximas mas não é claro quais.

Todas amostras eram homozigóticas (G) para a posição 311 de tubB3.





b)

Figura 19: Produtos de PCR das amostras 16-33, com *primers* para alelos específicos que amplificam um fragmento de aproximadamente 836 pb da região beta-tubulina 3 de *F. hepatica*, para respetivamente o SNP: a) G (*primers* BT3aF-311-t2G/ BT3aR) e b) A (*primers* BT3aF-311-t2A/ BT3aR). Com 5% DMSO. M: marcador. N: Controlo negativo.

Tabela 4. Polimorfismos detetados em amostras portuguesas em TubB3, em relação à região codificante da sequência de referência AM933587, de mRNA.

AMOSTRA	A309 (311)	A369	403	423	426	564	573	630	633	675	682	693	744	786	834	855	858	936	939	942	945
3	G	A	T	T	T	T	G	C	C	A	C	C	C	T	C	T	A	A	T	T	T
		G	G	C	C	C		T	T	G	T	T	T	A	T			G	C	C	C
38	G	A	T	T	T	C	A	C	C	A	C	C	C	T	C	C	A	A	T	T	T
				C	C		G	T	T	G	T	T	T	A		T	G			C	C

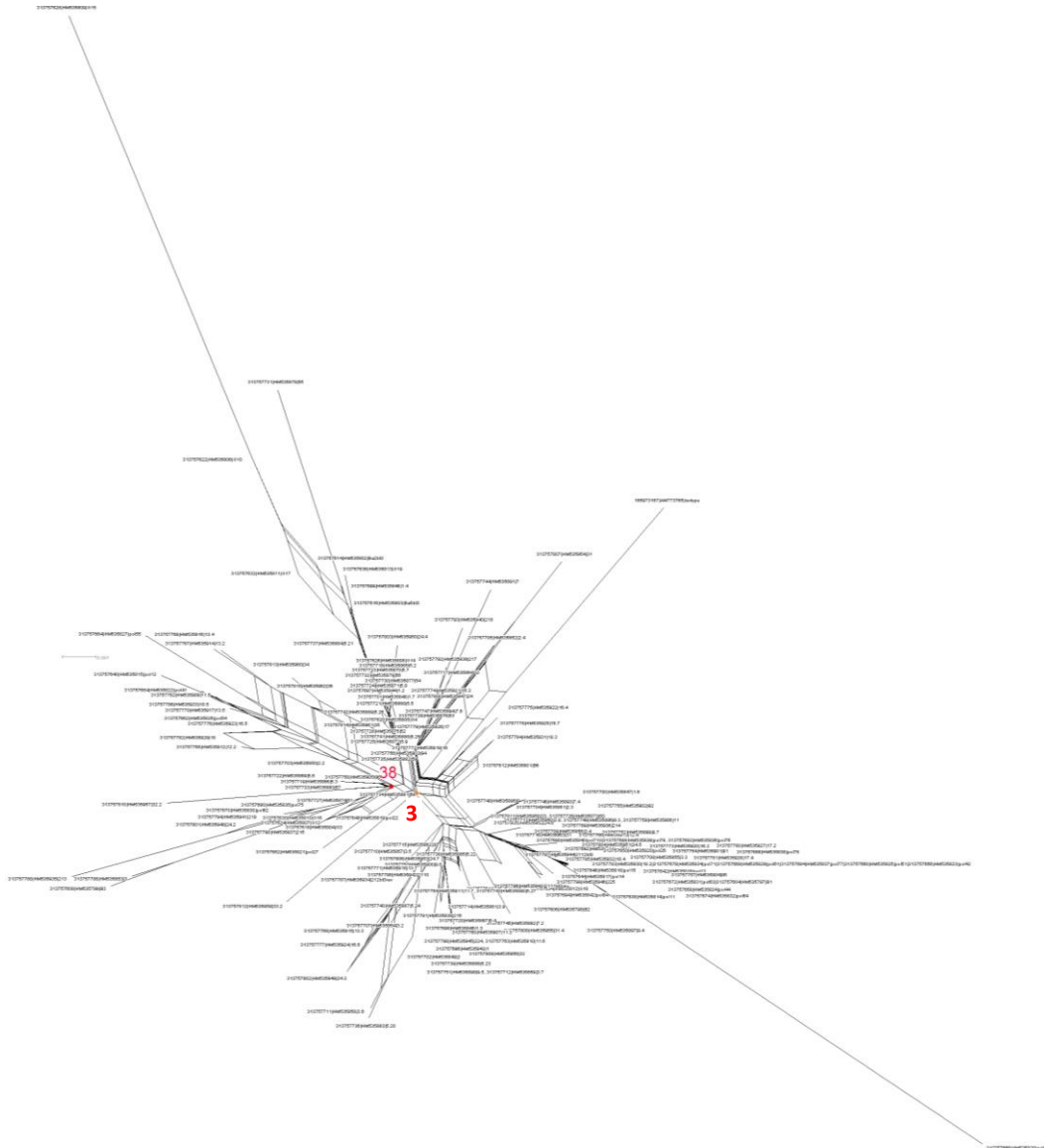


Figura 20: Rede filogenética com base em sequências de TubB3 de *F. hepatica* obtida através do programa SplitsTree4, com distâncias calculadas através do coeficiente de Kimura-2-parameter, e de acordo com o algoritmo NeighborNet. A vermelho estão as sequências determinadas neste trabalho.

Capítulo 4 – Discussão

4. Discussão

Neste trabalho estudaram-se quatro marcadores genéticos de *F. hepatica* em amostras de Portugal e Brasil, para uma avaliação preliminar da sua diversidade genética e comparação de dois marcadores com populações deste parasita no Leste Europeu (TEOFANOVA *et al.*, 2011). Avaliaram-se três marcadores nucleares: ITS1, para identificação da espécie, o gene ribossomal 28S e o gene para TubB3, que é um marcador candidato de resistência aos fármacos. Avaliou-se também um marcador mitocondrial: citocromo c oxidase I. Os marcadores foram amplificados por PCR e sequenciados. No caso de 28S e de tubB3 SNPs de interesse foram genotipados com PCR específico desenvolvido no âmbito deste trabalho.

Para desenvolvimento dos *primers* para PCR específico de alelos, escolheu-se uma posição em cada região, 28S e tubB3, para genotipagem com *primers* específicos: a posição 105 (A/G) de 28S, que tinha sido identificada como distinguindo duas linhagens principais no estudo de TEOFANOVA *et al.* (2011), e a posição 331 de tubB3, que tinha sido identificada como sendo a única no mesmo estudo em que a alteração da base alterava o amino ácido. Nos *primers*, a base de interesse localizou-se na extremidade 3', sendo usado o *primer* genérico na direção reversa. Contudo, a especificidade pode ser baixa quando há apenas uma base de diferença, principalmente se houver degradação do *primer* ou ação de remoção de bases desemparelhadas por parte da enzima *Taq* polimerase utilizada. Segundo Drenkard, *et al.*, (2000) **Cit.** por (LIU *et al.*, 2012), para facilitar a discriminação fiável entre dois alelos específicos, a adição de desemparelhamentos artificiais dentro das três bases da extremidade 3' dos *primers* pode ser benéfico. Para o tipo de SNP (G/A e A/G) que se propôs para o presente estudo, tinha sido concluído que o desemparelhamento na segunda posição era mais eficiente do que na terceira posição. Já para os iniciadores concebidos com SNP (A/T), o desemparelhamento (CA) no terceiro nucleótido da extremidade 3', tinham a maior especificidade de alelo (81,9%).

No presente trabalho não foram identificadas diferenças de especificidade entre as duas posições com bases desemparelhadas para os *primers* da posição 105 de 28S, que produziram um bom produto de amplificação sem produtos inespecíficos. Já para os *primers* da posição 311 de tubB3, a 2ª posição gerou resultados mais específicos, se bem que foi necessária a adição de 5% de DMSO para redução dos produtos não

específicos. Este é um resultado esperado, visto o desenho destes *primers* não permitir obedecer às regras ótimas por estar limitado pela localização dos *primers*. Não foi testado no decorrer deste projeto, porque se obteve resultados satisfatórios, mas poderiam ser testadas outras combinações de bases desemparelhadas ou com outro *primer* reverso.

A sequenciação do produto obtido por PCR de ITS1 de 20 amostras permitiu confirmar a sua identidade como *F. hepatica* e verificar a conservação desta região, apesar de em muitos organismos ser bastante polimórfico, e ao contrário de ITS2 e ao contrário do estudo realizado por SANTOS (2012), que tinha encontrado três variantes de ITS1 em Portugal.

As sequências de produtos de PCR de COI para as amostras selecionadas, Portuguesas e Brasileiras, revelaram genótipos heterozigóticos para esta região. Considerando a herança monoparental de mitocôndrias, seria de esperar monozigotia. As sequências deverão ser confirmadas com sequenciação no sentido inverso, que não foi realizado por limitações do projeto. Registaram-se, pela primeira vez, dois novos SNPs na sequência de COI, ambos na população Portuguesa, o que sugere alguma individualização desta população. Um terceiro SNP (em heterozigotia) apenas foi registado em estirpes de *F. gigantica*, o que pode ser devido a convergência ou ser um carácter ancestral. Tanto a população Portuguesa como a Brasileira revelaram possuir diversidade genética para este marcador, que poderá ser usado em estudos populacionais mais aprofundados. A rede filogenética com base em sequências de COI demonstrou semelhanças nas relações evolutivas entre espécies portuguesas e brasileiras, e em relação às sequências depositadas no GenBan, mas diferenças de origem das sequências, sugerindo a hipótese de importações de genótipos, mais do que evolução dentro da mesma população, o que já tinha sido verificado por SANTOS (2012), provavelmente devido ao comércio de animais entre estes países.

Apesar de ser um gene conservado, duas linhagens principais (b105A e b105G) tinham sido encontradas no rDNA 28S de *F. hepatica* na Europa Oriental e presentes em proporções comparáveis nos três países (Polónia, Bulgária e Grécia). As amostras Portuguesas e Brasileiras estudadas apresentaram, sem exceção, heterozigotia para aquela posição, que foi confirmada por sequenciação para uma amostra. Seria de esperar a deteção de sequências homozigóticas nas populações Portuguesa e Brasileira, sendo o

desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg estatisticamente significativo. A manutenção de 100% de heterozigotia nestas populações sugere ou partenogenicidade de indivíduos heterozigóticos, ou seleção diferencial de indivíduos heterozigóticos para esta região. Estas hipóteses deveriam ser investigadas futuramente. Visto as principais linhagens destas sequências se distinguirem por apenas uma posição, e ser uma região conservada, o PCR específico para este SNP demonstrou ser uma metodologia mais eficaz e com menos custos do que a sequenciação da região completa.

A análise da sequência da proteína que codifica o gene para a TubB3 não tinha revelado a existência de linhagens explícitas e estruturação genética de intrapopulações no estudo do leste Europeu (TEOFANOVA *et al.*, 2011). O SNP A311 de TubB3 que tinha sido encontrado somente entre as amostras Polacas e que alterava o amino ácido (TEOFANOVA *et al.*, 2011), e que foi genotipado por PCR específico neste estudo, não foi detetado em 94 amostras Portuguesas ou Brasileiras, sugerindo que seja específico da população Polaca. Contudo, foram detetados vários outros polimorfismos ao longo das sequências das duas amostras que foram verificadas, com muitas posições heterozigóticas, mas todos neutrais (não alteram os amino ácidos). Dado ser um SNP fixo, exceto na Polónia, deveria ser estudado laboratorialmente se está implicado em resistência a anti-helmínticos. Este marcador, devido à sua diversidade genética, poderá ser usado para estudos populacionais. Deste modo recomenda-se, de futuro, a sequenciação de mais amostras para avaliação da diversidade populacional em Portugal e no Brasil. Contudo, o PCR específico para a posição 331 será útil e eficiente para fazer um rastreio da presença ou não do polimorfismo que pode alterar o amino ácido, considerando que este gene é alvo de fármacos.

A rede filogenética com base em sequências de TubB3, por terem muitos sites heterozigóticos, posicionou as amostras portuguesas no centro, como seria de esperar para híbridos ou sequências heterozigóticas, e demonstrou distâncias significativamente próximas em relação a sequências depositadas no GenBank. Os resultados sugerem que nas populações de *F. hepatica* em Portugal possa haver introduções de outras regiões e hibridização.

Assim, apesar da baixa diversidade genética em Portugal, que SANTOS (2012) tinha sugerido que levaria a um baixo risco de resistência a fármacos, a migração entre

países, sugerida tanto por COI como por BTub3, pode permitir a introdução e expansão de possível resistência a anti-helmínticos em Portugal.

Capítulo 5 – Conclusões

5. Conclusões

Para o melhor conhecimento da estrutura populacional de *F. hepatica* em Portugal em relação ao leste da Europa e no Brasil, a nível de diferenciação populacional, estudaram-se quatro regiões genómicas, três nucleares e uma mitocondrial.

A região ITS1 permitiu identificar as amostras como *F. hepatica* e mostrou ser bastante conservada. A região 28S mostrou heterozigotia de uma posição que separa duas linhagens encontradas no leste Europeu, para todas as amostras Portuguesas e Brasileiras. As regiões COI e TubB3 apresentaram diversidade intra-populacional em Portugal e no Brasil e em relação a outras regiões, assim como heterozigotia em várias posições, e poderão ser usadas em estudos populacionais desta espécie. Para além disso, a migração sugerida por este estudo pode permitir a introdução e expansão de possível resistência a anti-helmínticos.

Desenvolveram-se métodos de PCR específicos para SNPs de interesse no gene para TubB3 e 28S, que caracterizaram eficientemente esses genótipos e permitiu avaliar a frequência de polimorfismos não sinónimos em TubB3, assim como de um marcador de linhagem em 28S. O desenho e uso de PCR para caracterização de SNPs revelou-se, assim, uma metodologia acessível e eficiente para determinação de SNPs em genes de *F. hepatica*, em alternativa à sequenciação, que pode ser mais cara e de difícil interpretação. Este tipo de técnica pode ser usada para avaliar as pressões seletivas a nível destes marcadores, no sentido de melhorar o controlo e o conhecimento sobre fatores de resistência a antihelmínticos.

Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

AFSHAN, K.; FORTES-LIMA, C. A.; ARTIGAS, P.; VALERO, M. A.; QAYYUM, M.; MAS-COMA, S. Impact of climate change and man-made irrigation systems on the transmission risk, long-term trend and seasonality of human and animal fascioliasis in Pakistan. **Geospatial health** 8.2 (2014): 317-334.

ANDREWS S. J. The life cycle of *Fasciola hepatica*. En: Fasciolosis, J. P. Dalton (Ed). London, UK, **CABI International**, (1999), p. 544.

ASHRAFI, K.; BARGUES, M.D.; O'NEILL, S.; MAS-COMA, S. Fascioliasis: A worldwide parasitic disease of importance in travel medicine. **Travel medicine and infectious disease** 12.6 (2014): 636-649.

AVISE, J. C. Phylogeography: The history and formation of species. Cambridge: **Harvard University Press**, (2000) p. 447.

BARGUES M. D.; VIGO M.; HORAK P.; DVORAK J.; PATZNER R. A.; POINTIER J. P.; JACKIEWICZ M.; MEIERBROOK C. & MAS-COMA S. European Lymnaeidae (Mollusca: Gastropoda), intermediate hosts of trematodiasis, based on nuclear ribosomal DNA ITS-2 sequences. **Infection, Genetics and Evolution** 1.2 (2001): 85-107.

BOISSIER, J.; MONE, H.; MITTA, G.; BARGUES, M. D.; MOLYNEUX, D.; MAS-COMA, S. Schistosomiasis reaches Europe. **Lancet Infect. Dis.** 15, (2015): 757–758.

BORAY, J. C. Experimental fascioliasis in Australia. **Adv. Parasitol.**, (1969). v.7, p. 95-210.

BORAY, J. C.; TAIRA, N.; YOSHIFUJI, H. Zoonotic Potencial of Infection with *Fasciola* ssp. by consumption of Freshly Prepared Raw Liver Containing Immature Flukes. **International Journal for Parasitology**. v.27, (1997), p. 775-77.

BOSSAERT, K.; FARNIR, F.; LECLIPTEUX, T.; PROTZ, M. O.; LONNEUX, J. O.; LOSSON, B. Humoral immune response in calves to single-dose, trickle and challenge

infections with *Fasciola hepatica*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 87, n. 1, (2000), p. 103-123.

BOWLES, J. & MCMANUS, D. P. Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. **Mol. Biochem. Parasitol.** (1992), 54: 165-174.

BOWLES, J. & MCMANUS, D. P. Rapid discrimination of *Echinococcus* species and strains using a polymerase chain reaction-based RFLP method. **Mol Biochem Parasitol**, 57(2): (1993): 231-239.

BRUMFIELD, R. T.; BEERLI, P.; NICKERSON, D. A.; EDWARDS, S. V. The utility of single nucleotide polymorphisms in inferences of population history. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 18, (2003) p. 249-256.

BUENO-SILVA, M. Genética molecular e sistemática animal: Um breve histórico, contribuições e desafios. **Estud. Biol., Ambiente Divers.** 34 (83), (2012) jul./dez., p. 157-163.

CARVALHO, CAMILLA DE MEDEIROS DE. Revisão taxonômica e elaboração de mapas de distribuição geográfica de espécies brasileiras da família Lymnaeidae Rafinesque, 1815 (Gastropoda, Basommatophora) / Camilla de Medeiros de Carvalho. – Belo Horizonte, (2014). XX, 115 f.: il.; 210 x 297mm. Bibliografia: f.: 107 – 135. Tese (Doutorado) – Tese para obtenção do título de Doutor em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias. Disponível em: http://www.cpqrr.fiocruz.br/texto-completo/T_57.pdf.

CARVALHO, O. S.; PASSOS, L. K. J.; MENDONÇA, C. L. F. G; CARDOSO, P. C. M. & CALDEIRA, R. L. Moluscos de importância médica no Brasil. Belo Horizonte, MG: **FIOCRUZ/Centro de Pesquisas René Rachou** (2005).

CHAMBERS, E; RYAN, L. A; HOEY, E. M; TRUDGETT A.; MCFERRAN, N. V.; FAIRWEATHER I, TIMSON DJ. Liver fluke β -tubulin isotype 2 binds albendazole and is thus a probable target of this drug. **Parasitology research** 107.5 (2010): 1257-1264.

- CHEN, M. G. & MOTT, K. E. Progress in assessment of morbidity due to *Fasciola hepatica* infection: a review of recent literature. **Tropical diseases bulletin** 87.4 (1990): R1-R38.
- CORAL, R. P.; MASTALIR, E. T.; MASTALIR, F. P. *Fasciola hepatica* removal from common duct through choledocoscopy." **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgias** 34.1 (2007): 69-71.
- CORDERO DEL CAMPILLO, M. & ROJO VÁZQUEZ, F. **Parasitologia Veterinaria** (1st ed). Madrid: McGraw-Hill. (1999).
- CORREA, A. C.; ESCOBAR, J.S; DURAND, P; RENAUD, F; DAVID, P; JRNAE, P; POINTIER, J. P; HURTREZ-BOUSSE, S. Bridging gaps in the molecular phylogeny of the Lymnaeidae (Gastropoda: Pulmonata), vectors of Fascioliasis. **BMC Evolutionary Biology** 10.1 (2010): 1.
- DAR, Y. D; RONDELAUD, D; DREYFUSS, G. Update of fasciolosis-transmitting snails in Egypt (review and comment). **J Egypt Soc Parasitol** 35, PMID 16083061. (2005), (2): 477–490.
- DUNG, B. T.; DOANH, P. N.; THE, D. T.; LOAN, H. T.; LOSSON, B. & CARON, Y. Morphological and Molecular Characterization of Lymnaeid Snails and Their Potential Role in Transmission of *Fasciola* spp. in Vietnam. **The Korean journal of parasitology** 51.6 (2013): 657-662.
- ECHEVARRIA, F. A. M. Fasciolose. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, v. 13, n. 1, (2004). p. 100-102.
- EICKBUSH, T. H. & EICKBUSH, D. G. Finely orchestrated movements: evolution of the ribosomal RNA genes. **Genetics** 175.2 (2007) p. 477-485.
- FAIRWEATHER I. Reducing the future threat from (liver) fluke: realistic prospect or quixotic fantasy . **Veterinary Parasitology** 180.1 (2011): 133-143.
- FAIRWEATHER I. Triclabendazole: new skills to unravel an old(ish) enigma. **J. Helminthol.** 79: (2005). 227-234.

FERREIRA, MARCELO URBANO. **Parasitologia contemporânea**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. x, 223 p.

FORTES, E. **Parasitologia veterinária**. São Paulo: Ícone, 4ª Ed. 2004.

FREELAND, J. R. Molecular Ecology. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd. PMCID: 548581. (2005).

GASSENBECK, C. P. H.; OVER, H. J.; NOORMAN, N. E.; DeLÉUW, W. A. Na epidemiological study of *Fasciola hepatica* in Netherlands. **Veterinary Quarterly**, n. 14, (1992) p. 140 -144.

GASSER, R. B. PCR-based technology in veterinary parasitology. **Veterinary parasitology** 84.3 (1999): 229-258.

GROSS, R.; NILSSON, J.; & SCHMITZ, M. A new species-specific nuclear DNA marker for identification of hybrids between Atlantic salmon and brown trout. **Journal of Fish Biology**, 49(3) 49(3), (1996), 537-540.

GUIMARÃES, C. T.; DE MAGALHÃES, J. V.; LANZA, M. A.; SCHEUSTER, I. Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento genético. **Informe Agropecuário, Belo Horizonte** 30.253 (2009): 86-95.

GUIMARÃES, MARCOS PEZZI. *Fasciola hepatica*. In: NEVES, David Pereira (Ed.). **Parasitologia humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, (2005). cap. 24.

HAROUN, E.T.M & HITLYER, G.V. Resistance to fascioliasis – a review. **Veterinary Parasitology**, v. 20, (1986) p. 63-93.

HARRISON, L. J. S.; HAMMOND, J. A. & SEWELL, M. M. H. Studies on helminthosis at the Centre for Tropical Veterinary Medicine (CTVM). **Tropical animal health and production** 28.1 (1996): 23-39.

HATSCHBACH, P. I. A. ***Fasciola hepatica* e sua história**. A hora Veterinária, Edição extra, n. 5, p. 10-11, 1995.

INVS-Institute de Veille Sanitaire. Epidémie de distomatose à *Fasciola hepatica* dans la région Nord Pas-de-Calais. Disponível em: http://www.invs.sante.fr/publications/2003/distomatose_2003/index.html

JEHAN, T.; LAKHANPAUL, S. Single Nucleotide Polymorphism (SNP) - Methods and application in plant genetics: a review. **Indian Journal of Biotechnology**, v.5, (2006) p. 435-459.

KAPLAN, R. M. *Fasciola hepatica*: A Review of the Economic Impact in Cattle and Considerations for Control. **Veterinary Therapeutics**, v. 2, n. 1 (2001): 40-50.

KUBISTOVA, Z.; FRANTISEK, M.; & MARTIN, P. "Polymorphisms of the immune response genes: selected biological, methodical and medical aspects." **Biomedical Papers of the medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czech Republic**, 153.2 (2009): 93-102.

KUMAR S, STECHER G, TAMURA K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Mol Biol Evol**. Vol. 33, nº 7 (2016) p.1870-1874.

LEWIS, S.; LEE, M. G.-S. & COWEN, N. J. Five mouse tubulin isotypes and their regulated expression during development. **Journal of Cell Biology** 101, (1985), 852±861.

LIU, J.; HUANG, S.; SUN, M.; LIU, S.; LIU, Y.; WANG, W.; ZHANG, X.; WANG, H. & HUA, W. An improved allele-specific PCR *primer* design method for SNP marker analysis and its application. **Plant Methods** 8.1 (2012): 1.

LOTFY, W. M.; BRANT, SARA V.; DEJONG, R. J.; LE, T. HOA; DEMIASZKIEWICZ, A.; RAJAPAKSE, R. P. V. J.; PERERA, V. B. V. P.; LAURSEN, J. R. & LOKER, E. S. Evolutionary Origins, Diversification, and Biogeography of Liver Flukes (Digenea, Fasciolidae). **Am J Trop Med Hyg**. 79(2): (2008), 248–255.

MARTÍNEZ-MORENO A.; JIMÉNEZ-LUQUE V.; MORENO T.; REDONDO E.S.H.; MARTÍN DE LÃS MULAS J. & PÉREZ J. Liver pathology and immune response in experimental *Fasciola hepatica* infection of goats. **Vet. Parasitol.**, 82: (1999), 19-33.

MAS-COMA S. Chapter 19: Human fascioliasis. In: Cotruvo, J. A.; Dufour A.; Rees, G.; Bartram J.; CARR R. (Eds.), World Health Organization (WHO), Waterborne

Zoonoses: Identification, Causes and Control. **IWA Publishing**, London, (2004), p. 305–322.

MAS-COMA, S.; FUNATSU, R.; BARGUES, M. D. *Fasciola hepatica* and lymnaeid snails occurring at very high altitude in South America. **Parasitology** 123.07 (2001) p. 115-127.

MAS-COMA, S.; BARGUES, M. D.; VALERO, M. A.; FUENTES, M. V. Adaptation capacities of *Fasciola hepatica* and their relationships with human fascioliasis: From below sea level up to the very high altitude. In: Combes, Jourdane (Eds.), Taxonomy, Ecology and Evolution of Metazoan Parasites, Presses Universitaires de Perpignan, **Perpignan**, France, vol. 2, (2003) p. 81–123.

MAS-COMA, S.; BARGUES, M. D.; VALERO, M. A. Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. **Int J Parasitol**; 35: (2005), 1255-1278.

MAS-COMA S.; BARGUES M. D. Human liver flukes: a review. **Res Rev Parasitol**.; 57 (1997):145–218.

MAS-COMA S.; ESTEBAN J. G. & BARGUES M. D. Epidemiology of human fascioliasis: a review and proposed new classification. **Bulletin of the World Health Organization**, 77, (1999), 340-346.

MAS-COMA, S.; AGRAMUNT, V. H.; VALERO, M. A. Neurological and ocular fascioliasis in humans. **Adv. Parasitol.** 84, (2014b) 27–149.

MAS-COMA, S.; BARGUES, M. D.; VALERO, M. A. Diagnosis of human fascioliasis by stool and blood techniques: update for the present global scenario. **Parasitology** 141.14 (2014a): 1918-1946.

MAS-COMA, S.; VALERO, M. A.; BARGUES, M. D. Effects of climate change on animal and zoonotic helminthiasis. **Rev. Sci. Techn. OIE** 27 (2), (2008), 443–457.

MAS-COMA, S.; VALERO, M. A.; BARGUES, M. D. *Fasciola*, lymnaeids and human fascioliasis with a global overview on disease transmission, epidemiology, evolutionary genetics, molecular epidemiology and control. **Adv. Parasitol.** 69, (2009a.), 41–146.

- MEKROUD A.; TITI A.; BENAKHLA A. & RONDELAUD D. The proportion of liver excised in Algerian abattoirs is not a good indicator of *Fasciola hepatica* infections in local cattle breeds. **Journal of Helminthology**, 80, (2006), 319-321.
- MENDES, E. A. Comportamento e desenvolvimento de *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758), de bovinos naturalmente infectados em sagüi (*Callithrix penicillata*) e gerbil (*Meriones unguiculatus*). **Belo Horizonte: Universidade** (2006).
- MEUNIER, C.; TIRARD, C.; HURTREZ-BOUSSES, S.; DURAND, P.; BARGUES M. D.; MAS-COMA, S.; POINTIER, J. P.; JOURDANE, J.; RENAUD F. Lack of molluscan host diversity and the transmission of an emerging parasitic disease in Bolivia. **Mol Ecol.**; 10 (2001): 1333–1340.
- MITCHELL, G. B. B. Treatment and control of liver fluke in sheep and cattle, Technical Note 557, Nov. (2004).
- MÜLLER, G.; JESUS, L.P.; PAULSEN, R.M.M.; SOUZA, C.A. Prevalência de fasciolose na região sul do Rio Grande do Sul, Brasil. In: **Congresso Brasileiro de Veterinária, Gramado**. (1997) p.186.
- MÜLLER, G.; RIET-CORREA; SCHILD A. L.; MÉNDEZ M. D. C.; LEMOS, R. A. A. Doenças de ruminantes e equinos, fascioloses, v.2, (2003), p. 118-130.
- MUNGUÍA-XÓCHIHUA, J.A., IBARRA-VELARDE, F., DUCOING-WATTY, A., MONTENEGRO-CRISTINO, N., QUIROZ-ROMERO, H. Prevalence of *Fasciola hepatica* (ELISA and fecal analysis) in ruminants from a semi-desert área in the northwest of Mexico. **Parasitology Research**. v.101, (2007), p.127-130.
- NUSSBAUM, R. L.; MCLNNES, R. R.; WILLARD, H. F. THOMPSON & THOMPSON: **Genética Médica**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, (2002).
- OLIVEIRA, S. M.; FILHA, E. S. Divulgação Técnica: Fasciolose *hepatica*. Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo, v, 71, n. 1, (jun., 2009), p. 5-7, jan..
- OUELLETTE, M. Biochemical and molecular mechanisms of drug resistance in parasites. **Trop. Med. Int. H.** (2001) 6:874–882.

- PERIAGO, M. V.; VALERO, M. A.; EL SAYED, M.; ASHRAFI, K.; EL WAKEEL, A.; MOHAMED, M. Y.; DESQUESNES, M.; CURTALE, F.; MAS-COMA, S.: First phenotypic description of *Fasciola hepatica*/*Fasciola gigantica* intermediate forms from the human endemic area of the Nile Delta, Egypt. *Infect Genet Evol*, 8: (2008), 51–58.
- RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C. & HINCHCLIFF, K. W. **Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos**. 9ª ed., Editora Guanabara Koogan, (2002), 1737p.
- RAPSCH, C.; DAHINDEN, T.; HEINZMANN, D.; TORGERSON, P. R.; BRAUN, U.; DEPLAZES, P.; HURNI, L.; BAR, H.; KNUBBEN-SCHWEIZER, G. An interactive map to assess the potential spread of *Lymnaea truncatula* and the free-living stages of *Fasciola hepatica* in Switzerland. **Veterinary Parasitology**, v. 154, (2008), p. 242-249.
- REY, L. **Bases da Parasitologia Médica**. 2ª edição, Rio de Janeiro. Guanabara Koogan: (2002) p. 379.
- RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; MÉNDEZ, M. C., LEMOS, R. A. A. **Doenças de Ruminantes e Equinos**. 2nd ed. Varela. São Paulo. (2001), 658p.
- ROBERTS, L. S.; JANOVY, J.; Gerald, D.; SCHMIDT & LARRY S. **Roberts' Foundations of Parasitology** (8th ed.). New York, NY, USA: McGraw-Hill, (2009).
- ROBINSON, M. W.; TRUDGETT A.; HOEY E. M.; FAIRWEATHER I. Triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica*: b-tubulin and response to in vitro treatment with triclabendazole. **Parasitol**. 124 (2001):325-338.
- ROJO-VÁZQUEZ, F. A.; MEANAB, A.; VALCÁRCEL, F.; MARTÍNEZ-VALLADARES, M. Update on trematode infections in sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 189, (2012) p. 15- 38.
- RONDELAUD, D.; DREYFUSS, G.; BOUTEILLE, B.; DARDÉ, M.L. Changes in human fasciolosis in a temperate area: about some observations over a 28-year period in central France. **Parasitology research** 86.9 (2000): 753-757.

- SANTOS, T. R. M. Genetic characterization of *Fasciola hepatica* populations in Portugal. Dissertation presented to obtain the Master Degree in Molecular, Genetics and Biomedicine. **FCT/UNL, UNL** (2012).
- SAVIOLI L, C. L.; Montresor, A. New opportunities for the control of fascioliasis. **Bull WHO** (1999);77:300.
- SCHACHER, J.F.; KHALIL, G.M.; SALMAN, S. A field study on Halzoun (parasitic pharyngitis) in Lebanon. **The American journal of tropical medicine and hygiene**. v.68, (1965), p.226-237.
- SERRA-FREIRE, N. M. Fasciolose *hepatica* no Brasil: Análise Retrospectiva e Prospectiva. **Caderno Técnico-Científico da Escola de Medicina Veterinária**, Ano 1, (1999), p. 9-70.
- SERRA-FREIRE, N. M. Fasciolose *hepatica*. **A Hora Veterinária**, v. 1, (1995), p. 13-19.
- STOTHARD, J. R, HUGHES, S.; ROLLINSON, D. Variation within the internal transcribed spacer (ITS) of ribosomal DNA genes of intermediate snail hosts within the genus *Bulinus* (Gastropoda: Planorbidae). **Acta Trop.** Mar; 61(1): (1996), 19-29.
- TENEVA, A. Molecular markers in animal genome analysis. **Biotechnology in Animal Husbandry**, 25(5-6), (2009), 1267-1284.
- TEOFANOVA, D.; KANTZOURA, V.; WALKER, S.; RADOSLAVOV, G.; HRISTOV, P.; THEODOROPOULOS, G.; BANKOV, I.; TRUDGETT, A. Genetic diversity of liver flukes (*Fasciola hepatica*) from Eastern Europe. **Infect Genet Evol.** Jan;11(1): (2011), 109-15.
- TEOFANOVA, D.; HRISTOV, P.; YOVEVA, A. & RADOSLAVOV, G. Issues Associated with Genetic Diversity Studies of the Liver Fluke, *Fasciola hepatica* (Platyhelminthes, Digenea, Fasciolidae). **INTECH Open Access Publisher**, 2012.
- THANH, N. T. G. Zoonotic fasciolosis in Vietnam: molecular identification and geographical distribution. Dissertation submitted in fulfillment of the requirements for the degree of Doctor (PhD) in Veterinary Sciences, (2012). Disponível em: <http://www.vpi.ugent.be/page13/files/giang-thanh-nguyen-thi-2.pdf>.

URQUHART, G. M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J. L.; DUNN, A. M. & JENNINGS F. M. Veterinary parasitology, 2nd edit. **Blackwell Science**, Oxford, (1996).

VASSILEV, G. D. & JOOSTE, R.. Production losses and control of fasciolosis in cattle in Zimbabwe. **Zimbabwe Veterinary Journal**, 22: (1991), 45–56.

VILLEGAS, F.; ANGLES, R.; BARRIENTOS, R.; BARRIOS, G.; VALERO, M. A.; HAMED, K.; GRUENINGER, H.; AULT, S. K.; MONTRESOR, A.; ENGELS, D.; MAS-COMA, S.; GABRIELLI, A. F. Administration of triclabendazole is safe and effective in controlling fascioliasis in an endemic community of the Bolivian Altiplano. **PLoS Negl Trop Dis** 6.8 (2012): e1720.

VITOVEC, J.; KOTRLA, B.; HAJI, H.; HAYLES, L. B. Fatal infection of an elephant calf caused by the trematode *Protofasciola robusta* (Lorenz, 1881) in Somaliland. *J Vet Med.*;31 (1984): 597–602.

WALKER, S. M.; JOHNSTON, C.; HOEY, E. M.; FAIRWEATHER, I.; BORGSTEEDE, F.; GAASENBEEK, C.; PRODÖHL, P. A., TRUDGETT, A. Population dynamics of the liver fluke, *Fasciola hepatica*: the effect of time and spatial separation on the genetic diversity of fluke populations in the Netherlands. **Parasitology** 138, (2011), 215–223.

WALKER, S. M.; PRODÖHL, P. A.; FLETCHER, H. L.; HANNA, R. E.; KANTZOURA, V.; HOEY, E. M.; TRUDGETT, A. Evidence for multiple mitochondrial lineages of *Fasciola hepatica* (liver fluke) within infrapopulations from cattle and sheep. *Parasitol. Res.* 101, (2007), 117–125.

WHO, World Health Organization. Neglected Tropical Diseases. A statistical update: latest data available. **WHO/HTM/NTD**. Geneva, Switzerland. (2014), 29 pp.

WHO. 2007. Action against worms. The neglected worms. Disponível em: <http://www.who.int/neglected_diseases/preventive_chemotherapy/Newsletter10.pdf> Acesso em: março, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases. World Health Organization, **WHO Headquarters**, Geneva, (2013), 138 pp.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of foodborne trematode infections. World Health Organization, **Technical Reports Series**, 849, (1995), 1-157.

XUAN, L.T.; HUNG, N.T.; WAIKAGUL, J. Cutaneous fascioliasis: a case report in Vietnam. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.72, n.5, (2005), p.508-509.

ZAIDEN, M. F.; SANTOS, B. M. O.; CANO, M. A. T.; NASCIF J. R, L. A. N. Epidemiologia das parasitoses intestinais em crianças de creches de Rio Verde-GO. **Medicina, Ribeirão Preto**, v. 41 (2), (2008), p. 182-187.

ZAROWIECKI, M.Z.; HUYSE, T.; LITTLEWOOD, D. T. J. Making the most of mitochondrial genomes- markers for phylogeny, molecular ecology and barcodes in *Schistosoma* (Platyhelminths: Digenea). **Int. J. Parasitol.** 37: (2007), 1401-1418.

Anexo 1**Tabela A1: Coleção de amostras de *F. hepatica* do Departamento de Helmintologia Médica do IHMT, com os respectivos códigos e datas.**

Nº	CÓDIGOS		DATAS DA COLHEITA
1	F1	-----	-----
2	F2	-----	-----
3	F3	-----	-----
4	F4	-----	-----
5	F5	-----	-----
6	F6	-----	-----
7	F7	-----	-----
8	F8	-----	-----
9	F9	-----	-----
10	F10	-----	-----
11	F11	-----	-----
12	F12	-----	-----
13	F13	-----	-----
14	F14	-----	-----
15	F15	-----	-----
16	PT 495242936	LOTE 138 (3)	13/7/2010
17	PT 513105745	RB53T	2/11/2010
18	PT 314782092	BOVINO/LADOCIRO/IDANHA-A-NOVA	-----
19	PT 815242939	SCA41	20/11/2010
20	PT 116133862	RBS3T	29/10/2010
21	PT 4152242936	SCA41 LOTE 138	13/7/2010
22	PT 715119067	REØ12 BOVINO (2)	29/7/2010
23	PT 214292556	PT SZ94A	28/6/2010
Nº	CÓDIGOS		DATAS DA

Anexo 1

			COLHEITA
24	PT 414171459	KDB85 (2)	8/2/2010
25	PT 414171489	KDB85	8/2/2010
26	PT 015407306	SCA41	26/5/2010
27	PT 215046597	SCA41 (1)	29/7/2010
28	PT 715459519	(2)	11/10/2010
29	PT 415242936	SCA41 LOTE 138	13/7/2010
30	PT 715459519	(1)	11/10/2010
31	PT 214564684	IDANHA-A-NOVA / BOVINO	-----
32	PT 3150466600	SCA41 (1)	29/6/2010
33	PT 3150466600	SCA41 (3)	29/6/2010
34	PT 413069887	OVINO LOTE 126	27/7/2010
35	PT 715122277	SCA 49 (3)	28/1/2010
36	PT 714764652	JTODS	12/10/2010
37	PT 714764652	JTODS (1)	12/10/2010
38	-----	SRA 94 OVINO	20/10/2010
39	PT 515105740	-----	11/10/2010
40	PT 31504660	SCA41 (2)	29/6/2010
41	PT 715122277	SCA41 (1)	28/1/2010
42	PT 414773110	RK 491	2/8/2010
43	PT 714764652	JTO 05 (3)	12/10/2010
44	PT 015046598	SCA41	1/6/2010
45	PT 615407308	SCA41	8/6/2010
46	PT 715122277	SCA41 (2)	28/11/2010
47	PT 014992964	SG9F8	8/2/2010
48	PT 715119067	REØ1Z (1)	29/7/2010
49	PT 915030422	SH 108	16/7/2010
50	PT 214564684	IDANHA-A-NOVA (2) BOVINO	-----
51	PT W806352	IDANHA-A-NOVA BOVINO MONTES DA RAIA Lda.	6/1/2010
Nº	CÓDIGOS		DATAS DA

Anexo 1

			COLHEITA
52	PT 815242939	SCA41 (2)	20/7/2010
53	PT 115498202	RB 53T	21/9/2010
54	PT 514436000	VN59D	22/9/2010
55	PT 215170266	RSØ7D BOVINO	2/8/2010
56	PT 314292565	SZ 94A	28/6/2010
57	PT 140628094	MONTES DA RAIA / IDANHA-A-NOVA / BOVINO	29/7/2010
58	PT 114965323	LADOEIRO / IDANHA-A-NOVA / BOVINO	-----
59	PT 314965322	LADOEIRO / IDANHA-A-NOVA / BOVINO	-----
60	PT 1145646675	LADOEIRO / IDANHA-A-NOVA / BOVINO	-----
61	PT 314782097	LADOEIRO / IDANHA-A-NOVA / BOVINO	-----
62	PT 514782096	LADOEIRO / IDANHA-A-NOVA / BOVINO	-----
63	PT 914571488	NV28 C	24/8/2009
64	PT 715122277	SCA41	28/1/2010
65	PT 314290801	SZ94A	2010
66	PT 515118455	SL4FZ	29/6/2010
67	PT 215046597	SCA41	29/6/2010
68	PT 413069887	OVINO LOTE 126	27/7/2010
69	PT 714880562	SH 108	25/5/2010
70	-----	RG 82 G	28/10/2009
71	PT 414971459	KDB 85	8/2/2010
72	PT 914773108	RK19K	2/8/2010
73	PT 714283370	SL4F2	29/6/2010
74	PT 315537066	RB53T	4/10/2010
Nº	CÓDIGOS		DATAS DA

Anexo 1

			COLHEITA
75	PT 015046598	SCA41	1/6/2010
76	PT 015407306	SCA41	26/5/2010
77	PT S15122278	SCA41	21/1/2010
78	PT 015536780	SCA41	7/1/2010
79	PT 014992964	SG9F8	8/2/2010
80	PT 114949761	RC	18/1/2010
81	PT 415407309	SCA41	15/1/2010
82	PT 214176023	SL4F2	28/1/2010
83	PT 7903120876	RY4Z	2/2/2010
84	PT 415407304	SCA41	26/5/2010
85	PT 215217140	SCA41	29/1/2010
86	PT 214401880	RBOY3	20/4/2010
87	PT 614507308	SCA41	8/1/2010

Tabela A2: Amostras de *F. hepatica* do Brasil (Espírito Santo)

Nº	CÓDIGOS	ANO DA COLHEITA
1	BR1	2015
2	BR2	2015
3	BR3	2015
4	BR4	2015
6	BR6	2015
11	BR11	2015
12	BR12	2015

Anexo 2**Tabela A3: Valores da quantificação do DNA nas amostras de *F. hepatica***

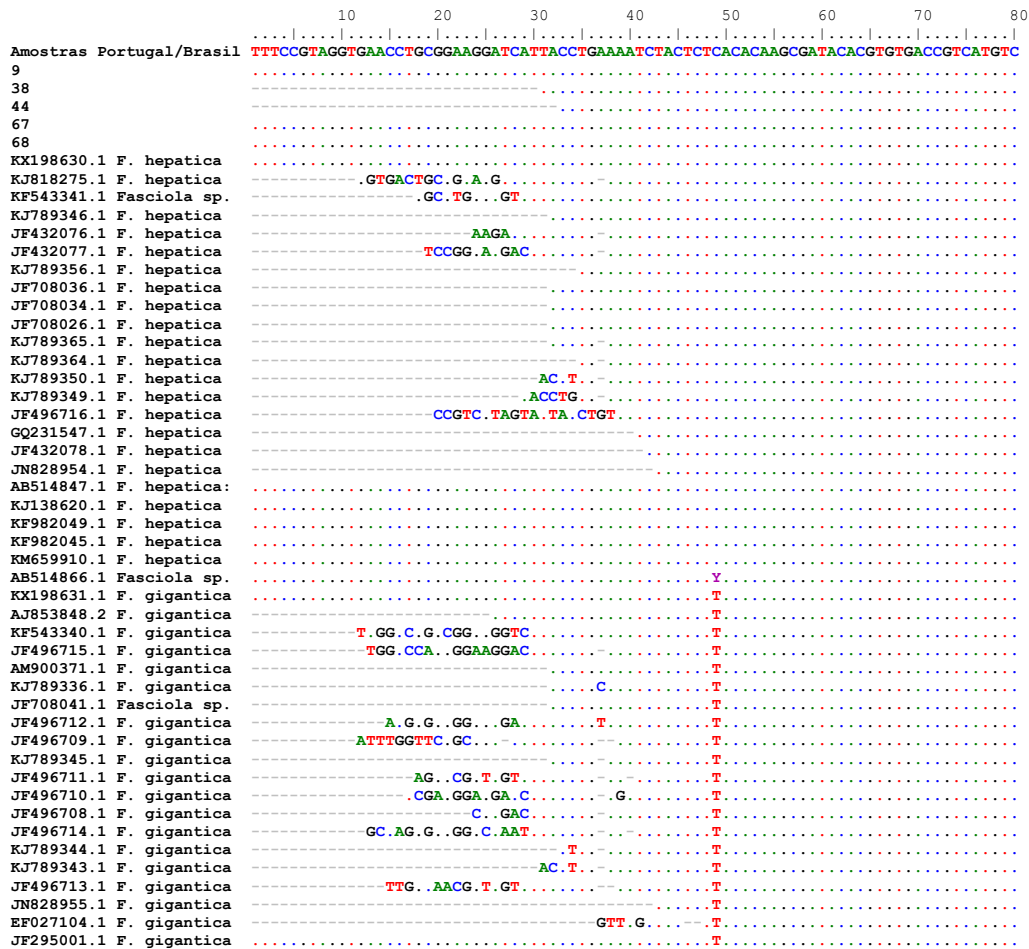
Sample ID	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230
F 1	26,12	0,522	0,306	1,71	1,04
F 2	360,25	7,205	3,446	2,09	1,87
F 3	565,2	11,304	5,58	2,03	1,88
F 4	536,68	10,734	5,283	2,03	1,96
F 5	385,96	7,719	3,732	2,07	1,83
F 6	537,53	10,751	5,3	2,03	1,92
F 7	260,26	5,205	2,534	2,05	1,86
F 8	316,65	6,333	3,023	2,09	1,95
F 9	422,83	8,457	4,072	2,08	1,86
F 10	304,82	6,096	2,991	2,04	1,92
F 11	322,41	6,448	3,105	2,08	1,74
F 12	278,44	5,569	2,687	2,07	1,88
F 13	920,85	18,417	8,649	2,13	1,77
F 14	449,41	8,988	4,313	2,08	1,98
F 15	373,67	7,473	3,675	2,03	1,74
16	810,02	16,2	7,851	2,06	2,09
17	1418,06	28,361	14,191	2	2,04
18	1437,64	28,753	14,169	2,03	1,92
19	1173,5	23,47	11,289	2,08	2,05
20	1184,86	23,697	11,317	2,09	2,03
21	911,43	18,229	8,716	2,09	2
22	891,65	17,833	8,61	2,07	2,1
23	604,8	12,096	6,103	1,98	2,13
24	833,11	16,662	7,997	2,08	2,11
25	1981,34	39,627	19,228	2,06	2,12
26	712,81	14,256	6,861	2,08	1,96
27	1113,77	22,275	10,86	2,05	2,05

Sample ID	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230
28	1234,22	24,684	11,879	2,08	2,04
29	1221,42	24,428	11,684	2,09	2,03
30	1735,73	34,715	16,806	2,07	2,1
31	1342,98	26,86	12,999	2,07	1,96
32	1107,55	22,151	10,773	2,06	1,85
33	1032,92	20,658	9,876	2,09	1,91
34	1427,51	28,55	14,055	2,03	1,91
35	1034,76	20,695	10,199	2,03	1,82
36	1494,12	29,882	14,586	2,05	1,84
37	1182,61	23,652	11,405	2,07	2
38	693,88	13,878	6,756	2,05	1,83
39	1244,72	24,894	11,934	2,09	1,94
40	852,53	17,051	8,288	2,06	1,89
41	829,99	16,6	8,159	2,03	1,91
42	864,6	17,292	8,491	2,04	1,91
43	537,46	10,749	5,929	1,81	1,3
44	1774,45	35,489	17,22	2,06	2,08
45	676,71	13,534	6,56	2,06	1,99
46	355	7,1	3,571	1,99	2
47	1586,62	31,732	15,293	2,07	2,12
48	1296,61	25,932	12,485	2,08	2,03
49	1382,59	27,652	13,418	2,06	2,07
50	1216,34	24,327	11,67	2,08	1,92
51	1280,13	25,603	12,31	2,08	2,09
52	709,32	14,186	7,023	2,02	1,98
53	377,7	7,554	3,789	1,99	2,1
54	775,57	15,511	7,662	2,02	2
55	1407,84	28,157	13,864	2,03	2,05
56	843,93	16,879	8,584	1,97	2,05
57	753,83	15,077	7,425	2,03	2,02
58	567,46	11,349	5,96	1,9	2,05

Sample ID	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230
59	782,24	15,645	7,721	2,03	1,88
60	1050,43	21,009	10,182	2,06	1,98
61	1354,14	27,083	13,118	2,06	2,02
62	1056,25	21,125	10,403	2,03	2,06
63	602,49	12,05	6,765	1,78	1,24
64	360,93	7,219	3,824	1,89	1,87
65	803,41	16,068	7,806	2,06	2
66	788,06	15,761	7,753	2,03	1,73
67	664,28	13,286	6,594	2,01	1,88
68	526,54	10,531	5,48	1,92	1,86
69	832,14	16,643	8,236	2,02	1,95
70	753,45	15,069	7,61	1,98	1,84
71	165,73	3,315	1,7	1,95	2,15
72	1169,5	23,39	11,42	2,05	2,02
73	919,69	18,394	9,072	2,03	1,98
74	693,78	13,876	6,919	2,01	2,08
75	550,23	11,005	6,101	1,8	1,73
76	399,12	7,982	4,286	1,86	1,77
77	281,73	5,635	2,884	1,95	1,99
78	392,32	7,846	4,269	1,84	1,63
79	1041,22	20,824	10,679	1,95	2,01
80	876,61	17,532	9,053	1,94	1,78
81	945,85	18,917	9,659	1,96	1,83
82	505,89	10,118	5,349	1,89	2,03
83	496,95	9,939	5,393	1,84	1,47
84	351,49	7,03	3,618	1,94	2,1
85	968,47	19,369	9,759	1,98	1,9
86	876,02	17,52	8,751	2	1,75
87	306,85	6,137	3,21	1,91	1,76

Anexo 3

Figura A1. Alinhamento das sequências de ITS1 obtidas durante o decurso deste projeto em relação às sequências depositadas no GenBank, em BioEdit. “Amostras Portugal/Brasil” corresponde a amostras: 3, 5, 17, 20, 23, 26, 34, 46, 53, 70, 73, 77, Br1, Br4, Br11.



Anexo 3

	90	100	110	120	130	140	150	160
Amostras Portugal/Brasil.....								
3 5 17 20 23 26 Br 34	ATGCGATAAAAA	TTTGGGACGGCT	TATGCCTGGCTC	ATTGAGGT	CACAGCATAT	CCGAACACTG	ATGGGGTGCCT	ACCTG
9								
38								
44								
67								
68								
KX198630.1 F. hepatica								
KJ818275.1 F. hepatica								
KF543341.1 Fasciola sp.								
KJ789346.1 F. hepatica								
JF432076.1 F. hepatica								
JF432077.1 F. hepatica								
KJ789356.1 F. hepatica								
JF708036.1 F. hepatica								
JF708034.1 F. hepatica								
JF708026.1 F. hepatica								
KJ789365.1 F. hepatica								
KJ789364.1 F. hepatica								
KJ789350.1 F. hepatica								
KJ789349.1 F. hepatica								
JF496716.1 F. hepatica						T		
GQ231547.1 F. hepatica								
JF432078.1 F. hepatica								
JN828954.1 F. hepatica								
AB514847.1 F. hepatica:								
KJ138620.1 F. hepatica								
KF982049.1 F. hepatica								
KF982045.1 F. hepatica								
KM659910.1 F. hepatica								
AB514866.1 Fasciola sp.						W		
KX198631.1 F. gigantica						T		
AJ853848.2 F. gigantica						T		
KF543340.1 F. gigantica						T		
JF496715.1 F. gigantica						T		
AM900371.1 F. gigantica						T		
KJ789336.1 F. gigantica						T		
JF708041.1 Fasciola sp.						T		
JF496712.1 F. gigantica						T		
JF496709.1 F. gigantica						T		
KJ789345.1 F. gigantica						T		
JF496711.1 F. gigantica						T		
JF496710.1 F. gigantica						T		
JF496708.1 F. gigantica						T		
JF496714.1 F. gigantica						T		
KJ789344.1 F. gigantica						T		
KJ789343.1 F. gigantica						T		
JF496713.1 F. gigantica						T		
JN828955.1 F. gigantica						T		
EF027104.1 F. gigantica						T		
JF295001.1 F. gigantica						T		

Anexo 3

	170	180	190	200	210	220	230	240
Amostras Portugal/Brasil	TATGATAC	TCGGATGG	TATGCTT	GCGTCT	CGGGGCG	CTTG	CCAAGCC	AGGAGAACGGGTTGTACTGCCACGATTGGT
9								
38								
44								
67								
68								
KX198630.1 F. hepatica								
KJ818275.1 F. hepatica								
KF543341.1 Fasciola sp.								
KJ789346.1 F. hepatica								
JF432076.1 F. hepatica								
JF432077.1 F. hepatica								
KJ789356.1 F. hepatica								
JF708036.1 F. hepatica								
JF708034.1 F. hepatica								
JF708026.1 F. hepatica								
KJ789365.1 F. hepatica								
KJ789364.1 F. hepatica								
KJ789350.1 F. hepatica								
KJ789349.1 F. hepatica								
JF496716.1 F. hepatica								
GQ231547.1 F. hepatica								
JF432078.1 F. hepatica								
JN828954.1 F. hepatica								
AB514847.1 F. hepatica:								
KJ138620.1 F. hepatica								
KF982049.1 F. hepatica								
KF982045.1 F. hepatica								
KM659910.1 F. hepatica								
AB514866.1 Fasciola sp.								Y
KX198631.1 F. gigantica								T
AJ853848.2 F. gigantica								T
KF543340.1 F. gigantica								T
JF496715.1 F. gigantica								T
AM900371.1 F. gigantica								T
KJ789336.1 F. gigantica								T
JF708041.1 Fasciola sp.								T
JF496712.1 F. gigantica								T
JF496709.1 F. gigantica								T
KJ789345.1 F. gigantica								T
JF496711.1 F. gigantica								T
JF496710.1 F. gigantica								T
JF496708.1 F. gigantica								T
JF496714.1 F. gigantica								T
KJ789344.1 F. gigantica								T
KJ789343.1 F. gigantica								T
JF496713.1 F. gigantica								T
JN828955.1 F. gigantica								T
EF027104.1 F. gigantica								T
JF295001.1 F. gigantica								T

Anexo 3

	250	260	270	280	290	300	310	320
Amostras Portugal/Brasil	AGT	GCT	AGG	CTT	AAAG	GAG	GAT	TTT
9	GGG	CTA	CGG	CCCT	GCT	CCG	CCCT	TAT
38	GAA	CTG	TTC	ATT	ACT	GTT	TTC	ATT
44	TAC	TAC	ATT	TAC	ACT	TGT	TAC	ACT
67	TGT	TAC	ACT	TGT	TAC	ACT	TGT	TAC
68	ACT	TGT	TAC	ACT	TGT	TAC	ACT	TGT
KX198630.1 F. hepatica
KJ818275.1 F. hepatica
KF543341.1 Fasciola sp.
KJ789346.1 F. hepatica
JF432076.1 F. hepatica
JF432077.1 F. hepatica
KJ789356.1 F. hepatica
JF708036.1 F. hepatica
JF708034.1 F. hepatica
JF708026.1 F. hepatica
KJ789365.1 F. hepatica
KJ789364.1 F. hepatica
KJ789350.1 F. hepatica
KJ789349.1 F. hepatica
JF496716.1 F. hepatica
GQ231547.1 F. hepatica
JF432078.1 F. hepatica
JN828954.1 F. hepatica
AB514847.1 F. hepatica:
KJ138620.1 F. hepatica
KF982049.1 F. hepatica
KF982045.1 F. hepatica
KM659910.1 F. hepatica
AB514866.1 Fasciola sp.	W
KX198631.1 F. gigantica	A
AJ853848.2 F. gigantica	A
KF543340.1 F. gigantica	A
JF496715.1 F. gigantica	A
AM900371.1 F. gigantica	A
KJ789336.1 F. gigantica	A
JF708041.1 Fasciola sp.	A
JF496712.1 F. gigantica	C
JF496709.1 F. gigantica	A
KJ789345.1 F. gigantica	A
JF496711.1 F. gigantica	A
JF496710.1 F. gigantica	A
JF496708.1 F. gigantica	N
JF496714.1 F. gigantica	A
KJ789344.1 F. gigantica	A
KJ789343.1 F. gigantica	A
JF496713.1 F. gigantica	C
JN828955.1 F. gigantica	A
EF027104.1 F. gigantica	A
JF295001.1 F. gigantica	A

Anexo 3

	330	340	350	360	370	380	390	400
Amostras Portugal/Brasil	TAAAGTGGTACTGAATGGCTTGCCATTCTTTGCCATTGCCCTCGCATGCACCCGGTCCCTGTGGCTGGACTGCACGTACG							
9								
38								
44								
67								
68								
KX198630.1 F. hepatica								
KJ818275.1 F. hepatica								
KF543341.1 Fasciola sp.								
KJ789346.1 F. hepatica								
JF432076.1 F. hepatica								
JF432077.1 F. hepatica								
KJ789356.1 F. hepatica								
JF708036.1 F. hepatica								
JF708034.1 F. hepatica								
JF708026.1 F. hepatica								
KJ789365.1 F. hepatica								
KJ789364.1 F. hepatica								
KJ789350.1 F. hepatica								
KJ789349.1 F. hepatica								
JF496716.1 F. hepatica								
GQ231547.1 F. hepatica								
JF432078.1 F. hepatica								
JN828954.1 F. hepatica								
AB514847.1 F. hepatica:								
KJ138620.1 F. hepatica								
KF982049.1 F. hepatica								
KF982045.1 F. hepatica								
KM659910.1 F. hepatica								
AB514866.1 Fasciola sp.								
KX198631.1 F. gigantica								
AJ853848.2 F. gigantica								
KF543340.1 F. gigantica								
JF496715.1 F. gigantica								
AM900371.1 F. gigantica								
KJ789336.1 F. gigantica								
JF708041.1 Fasciola sp.								
JF496712.1 F. gigantica								
JF496709.1 F. gigantica								
KJ789345.1 F. gigantica								
JF496711.1 F. gigantica								
JF496710.1 F. gigantica								
JF496708.1 F. gigantica								
JF496714.1 F. gigantica								
KJ789344.1 F. gigantica								
KJ789343.1 F. gigantica								
JF496713.1 F. gigantica								
JN828955.1 F. gigantica								
EF027104.1 F. gigantica								
JF295001.1 F. gigantica								

Anexo 3

	410	420	430	440	450	460	470	480
Amostras Portugal/Brasil	T	C	G	C	C	G	G	G
9	T	G	C	C	C	G	G	G
38	T	G	C	C	C	G	G	G
44	T	G	C	C	C	G	G	G
67	T	G	C	C	C	G	G	G
68	T	G	C	C	C	G	G	G
KX198630.1 F. hepatica	T	G	C	C	C	G	G	G
KJ818275.1 F. hepatica	T	G	C	C	C	G	G	G
KF543341.1 Fasciola sp.	T	G	C	C	C	G	G	G
KJ789346.1 F. hepatica	T	G	C	C	C	G	G	G
JF432076.1 F. hepatica	T	G	C	C	C	G	G	G
JF432077.1 F. hepatica	T	G	C	C	C	G	G	G
KJ789356.1 F. hepatica	T	G	C	C	C	G	G	G
JF708036.1 F. hepatica	T	G	C	C	C	G	G	G
JF708034.1 F. hepatica	T	G	C	C	C	G	G	G
JF708026.1 F. hepatica	T	G	C	C	C	G	G	G
KJ789365.1 F. hepatica	T	G	C	C	C	G	G	G
KJ789364.1 F. hepatica	T	G	C	C	C	G	G	G
KJ789350.1 F. hepatica	T	G	C	C	C	G	G	G
KJ789349.1 F. hepatica	T	G	C	C	C	G	G	G
JF496716.1 F. hepatica	T	G	C	C	C	G	G	G
GQ231547.1 F. hepatica	T	G	C	C	C	G	G	G
JF432078.1 F. hepatica	T	G	C	C	C	G	G	G
JN828954.1 F. hepatica	T	G	C	C	C	G	G	G
AB514847.1 F. hepatica:	T	G	C	C	C	G	G	G
KJ138620.1 F. hepatica	T	G	C	C	C	G	G	G
KF982049.1 F. hepatica	T	G	C	C	C	G	G	G
KF982045.1 F. hepatica	T	G	C	C	C	G	G	G
KM659910.1 F. hepatica	T	G	C	C	C	G	G	G
AB514866.1 Fasciola sp.	T	G	C	C	C	G	G	G
KX198631.1 F. gigantica	T	G	C	C	C	G	G	G
AJ853848.2 F. gigantica	T	G	C	C	C	G	G	G
KF543340.1 F. gigantica	T	G	C	C	C	G	G	G
JF496715.1 F. gigantica	T	G	C	C	C	G	G	G
AM900371.1 F. gigantica	T	G	C	C	C	G	G	G
KJ789336.1 F. gigantica	T	G	C	C	C	G	G	G
JF708041.1 Fasciola sp.	T	G	C	C	C	G	G	G
JF496712.1 F. gigantica	T	G	C	C	C	G	G	G
JF496709.1 F. gigantica	T	G	C	C	C	G	G	G
KJ789345.1 F. gigantica	T	G	C	C	C	G	G	G
JF496711.1 F. gigantica	T	G	C	C	C	G	G	G
JF496710.1 F. gigantica	T	G	C	C	C	G	G	G
JF496708.1 F. gigantica	T	G	C	C	C	G	G	G
JF496714.1 F. gigantica	T	G	C	C	C	G	G	G
KJ789344.1 F. gigantica	T	G	C	C	C	G	G	G
KJ789343.1 F. gigantica	T	G	C	C	C	G	G	G
JF496713.1 F. gigantica	T	G	C	C	C	G	G	G
JN828955.1 F. gigantica	T	G	C	C	C	G	G	G
EF027104.1 F. gigantica	T	G	C	C	C	G	G	G
JF295001.1 F. gigantica	T	G	C	C	C	G	G	G

Anexo 3

	490	500	510	520	530	540	550
Amostras Portugal/Brasil	GGCTCGTGTGTCGATGAAGAGCGCAGCCAACTGTGTGAATTAATGCAAACTGCATACCTGCTTTGAACATCGACATTTC						
9							
38							
44							
67							
68							
KX198630.1 F. hepatica							C.T
KJ818275.1 F. hepatica							
KF543341.1 Fasciola sp.							C.T
KJ789346.1 F. hepatica							C.T
JF432076.1 F. hepatica							C.T
JF432077.1 F. hepatica							C.T
KJ789356.1 F. hepatica							C.T
JF708036.1 F. hepatica							C.T
JF708034.1 F. hepatica						C.	C.T
JF708026.1 F. hepatica							C.T
KJ789365.1 F. hepatica							C.T
KJ789364.1 F. hepatica							C.T
KJ789350.1 F. hepatica							C.T
KJ789349.1 F. hepatica							C.T
JF496716.1 F. hepatica							C.T
GQ231547.1 F. hepatica							C.T
JF432078.1 F. hepatica							C.T
JN828954.1 F. hepatica							C.T
AB514847.1 F. hepatica:							
KJ138620.1 F. hepatica		CG.		AA			
KF982049.1 F. hepatica							
KF982045.1 F. hepatica							
KM659910.1 F. hepatica							
AB514866.1 Fasciola sp.							
KX198631.1 F. gigantica							C.T
AJ853848.2 F. gigantica							C.T
KF543340.1 F. gigantica							C.T
JF496715.1 F. gigantica							C.T
AM900371.1 F. gigantica							C.T
KJ789336.1 F. gigantica							C.T
JF708041.1 Fasciola sp.						C.	C.T
JF496712.1 F. gigantica							C.T
JF496709.1 F. gigantica							C.T
KJ789345.1 F. gigantica							C.T
JF496711.1 F. gigantica							C.T
JF496710.1 F. gigantica							C.T
JF496708.1 F. gigantica							C.T
JF496714.1 F. gigantica							C.T
KJ789344.1 F. gigantica							C.T
KJ789343.1 F. gigantica							C.T
JF496713.1 F. gigantica							C.T
JN828955.1 F. gigantica							C.T
EF027104.1 F. gigantica							
JF295001.1 F. gigantica							

Nota:

Referências completas das sequências obtidas do GenBank, por ordem do alinhamento

- KX198630.1 F. hepatica 34343|KX198629.1 F. hepatica 43345|KX198628.1 F. hepatica 8772|KX198627.1 F. hepatica 65454|KX198626.1 F. hepatica 674343
- KJ818275.1 F. hepatica
- KF543341.1 Fasciola sp. GHL-2014
- KJ789346.1 F. hepatica YW_2014.5.4.13|JF708029.1 F. hepatica FhAM1|AM709498.1 F. hepatica FhBt6|AM709499.1 F. hepatica FhCp1|AM709609.1 F. hepatica FhBt8|AM709610.1 F. hepatica FhBt10|AM709611.1 F. hepatica FhBt11|AM709612.1 F. hepatica FhBt5|AM709613.1 F. hepatica FhBt9|AM709614.1 F. hepatica FhBt7|AM709615.1 F. hepatica FhBt12|AM709616.1 F. hepatica FhBt13|AM709618.1 F. hepatica FhBt15|AM709619.1 F. hepatica FhBt16|AM709643.1 F. hepatica FhCc2|AM709644.1 F. hepatica FhCe3|AM709645.1 F. hepatica FhDd3|AM709646.1 F. hepatica FhEc5|AM709647.1 F. hepatica FhOa3|AM709648.1 F. hepatica FhOa6|AM709649.1 F. hepatica FhRp2|AM900370.1 F. hepatica FhCTO6|AM850107.1 F. hepatica FhCTO6|JF708027.1 F. hepatica FhGSG18|JF708028.1 F. hepatica FhGSG19|JF708030.1 F. hepatica FhAM2|JF708031.1 F. hepatica FhAM3|JF708032.1 F. hepatica FspGXG3|JF708033.1 F. hepatica FhFG5|JF708035.1 F. hepatica FhSPB|JF708037.1 F. hepatica FhSPH|AM707030.1 F. hepatica FhCe4|AM709500.1 F. hepatica FhDd2|AM709617.1 F. hepatica FhBt14|AM709620.1 F. hepatica FhBt17|AM709621.1 F. hepatica FhBt18|AM709622.1 F. hepatica FhBt19

- JF432076.1 F. hepatica FhS2
- JF432077.1 F. hepatica FhC1
- KJ789356.1 F. hepatica YW_2014.5.4.24
- JF708036.1 F. hepatica FhSPO
- JF708034.1 F. hepatica FhFG8
- JF708026.1 F. hepatica FhGSG17
- KJ789365.1 F. hepatica YW_2014.5.4.35|KJ789361.1 F. hepatica YW_2014.5.4.29|KJ789360.1 F. hepatica YW_2014.5.4.28|KJ789358.1 F. hepatica YW_2014.5.4.26|KJ789357.1 F. hepatica YW_2014.5.4.25|KJ789355.1 F. hepatica YW_2014.5.4.23|KJ789354.1 F. hepatica YW_2014.5.4.22|KJ789353.1 F. hepatica YW_2014.5.4.21|KJ789352.1 F. hepatica YW_2014.5.4.20|KJ789351.1 F. hepatica YW_2014.5.4.18|KJ789348.1 F. hepatica YW_2014.5.4.15|KJ789347.1 F. hepatica YW_2014.5.4.14|KJ789331.1 F. hepatica YW_2014.5.4|KJ789359.1 F. hepatica YW_2014.5.4.27|KJ789362.1 F. hepatica YW_2014.5.4.31|KJ789363.1 F. hepatica YW_2014.5.4.32
- KJ789364.1 F. hepatica YW_2014.5.4.33
- KJ789350.1 F. hepatica YW_2014.5.4.17
- KJ789349.1 F. hepatica YW_2014.5.4.16
- JF496716.1 F. hepatica FhF3
- GQ231547.1 F. hepatica Ari 11|GQ231546.1 F. hepatica Ari 13|JF423939.1 F. hepatica haplotype H1
- JF432078.1 F. hepatica FhC4
- JN828954.1 F. hepatica AKC2|JN828959.1 F. hepatica SRC3|JN828960.1 F. hepatica SRS4|JF432075.1 F. hepatica FhS1|JF432072.1 F. hepatica FhS11|JF432071.1 F. hepatica FhS3|HM746786.1 F. hepatica FhS15|HM746785.1 F. hepatica FhC5
- AB514847.1 F. hepatica: h1|AB514848.1 F. hepatica: h3|AB514849.1 F. hepatica: Australia|AB514850.1 F. hepatica: UK1|AB514851.1 F. hepatica: H1-1|AB514852.1 F. hepatica: U1-1|AB514858.1 Fasciola sp. Wuh6-2 |AB514859.1 Fasciola sp. Wuh15-1 |AB514860.1 Fasciola sp. Wuh15-2 |AB514861.1 Fasciola sp. Wuh16-1 |JF294998.1 F. hepatica ABC-01 |JF294999.1 F. hepatica ABC-02
- KJ138620.1 F. hepatica IH1
- KF982049.1 F. hepatica ADS1
- KF982045.1 F. hepatica ADS8
- KM659910.1 F. hepatica Fh-A3 |KM659908.1 F. hepatica Fh-CSC8 |KM659907.1 F. hepatica Fh-M11i |KM659905.1 F. hepatica S215 |KM659909.1 F. hepatica Fh-ColA7 |KM659906.1 F. hepatica Fh-R35
- AB514866.1 Fasciola sp. Hiroshima |AB514867.1 Fasciola sp. Kagoshima |AB514868.1 Fasciola sp. HS3 |AB514869.1 Fasciola sp. HS8 |AB514870.1 Fasciola sp. V-5 |AB514871.1 Fasciola sp. V-8
- KX198631.1 F. gigantica 5654456|KX198625.1 F. gigantica 9687|KX198624.1 F. gigantica 85675|KX198623.1 F. gigantica 76454|KX198622.1 F. gigantica 76543|KX198621.1 F. gigantica 07345|KX198620.1 F. gigantica T87767|KX198619.1 F. gigantica 87555|KX198618.1 F. gigantica 76544|KX198617.1 F. gigantica 76755|KX198616.1 F. gigantica 54343|KF425321.1 F. gigantica strain FGPC2012-1
- AJ853848.2 F. gigantica Bobo Dioulasso|HQ197358.1 F. gigantica MA01 |HQ197359.1 F. gigantica MA02
- KF543340.1 F. gigantica
- JF496715.1 F. gigantica FhF2
- AM900371.1 F. gigantica ITS1, 5.8S rRNA gene and ITS2, FgCAY1|AM850108.1 F. gigantica FgCAY1|JF708038.1 F. gigantica FgGXB26|JF708039.1 F. hepatica FgGXB27|JF708040.1 F. hepatica FgGXB28

- KJ789336.1 *F. gigantica* YW_2014.5.4.5
- JF708041.1 *Fasciola* sp. MXC-2011 FhHLC10|JF708042.1 *Fasciola* sp. MXC-2011 FhHLC11|JF708043.1 *Fasciola* sp. MXC-2011 FhHLC12
- JF496712.1 *F. gigantica* FgDH5
- JF496709.1 *F. gigantica* FgDH2
- KJ789345.1 *F. gigantica* YW_2014.5.4.34|KJ789341.1 *F. gigantica* YW_2014.5.4.10|KJ789340.1 *F. gigantica* YW_2014.5.4.9|KJ789339.1 *F. gigantica* YW_2014.5.4.8|KJ789342.1 *F. gigantica* YW_2014.5.4.11|KJ789338.1 *F. gigantica* YW_2014.5.4.7|KJ789337.1 *F. gigantica* YW_2014.5.4.6|KJ789335.1 *F. gigantica* YW_2014.5.4.4|KJ789334.1 *F. gigantica* YW_2014.5.4.3|KJ789333.1 *F. gigantica* YW_2014.5.4.2|KJ789332.1 *F. gigantica* YW_2014.5.4.1
- JF496711.1 *F. gigantica* FgDH4
- JF496710.1 *F. gigantica* FgDH3
- JF496708.1 *F. gigantica* FgDH1
- JF496714.1 *F. gigantica* FhF1
- KJ789344.1 *F. gigantica* YW_2014.5.4.30
- KJ789343.1 *F. gigantica* YW_2014.5.4.12
- JF496713.1 *F. gigantica* FhDh6
- JN828955.1 *F. gigantica* AS2|JN828956.1 *F. gigantica* AC3|JN828953.1 *F. gigantica* AKS1|JN828957.1 *F. gigantica* SRC1|JN828958.1 *F. gigantica* SRS2|JF432074.1 *F. gigantica* FgC9|JF432073.1 *F. gigantica* FgC3|HM746788.1 *F. gigantica* FgS9|HM746787.1 *F. gigantica* FgS2
- EF027104.1 *F. gigantica*
- JF295001.1 *F. gigantica* ABC-04 |AB514853.1 *F. gigantica*: Thai1|AB514854.1 *F. gigantica*: Thai2|AB514855.1 *F. gigantica*: Chew4|AB514856.1 *F. gigantica*: V-3|AB514857.1 *F. gigantica*: V-6|AB514862.1 *Fasciola* sp. Tokushima |AB514863.1 *Fasciola* sp. Nagano3 |AB514864.1 *Fasciola* sp. HS5 |AB514865.1 *Fasciola* sp. V-39 |JF295000.1 *F. gigantica* ABC-03

Anexo 4

Figura A2. Alinhamento das sequências de COI obtidas durante o decurso deste projeto em relação às sequências depositadas no GenBank, em BioEdit.



Anexo 4

	100	110	120	130	140	150	160	170	180
3	G T A T G T T T A G G T A G T G T T G T T T G G G C T C A T C A T A T G T T A T G G T G G G T T T G G A T G T G C A T A C T G C T G T T T T T T A G T T C T G T T A C C A T G								
5					Y W				T
9					Y				T
17					Y W				T
20					Y W				T
23									T
26					W				T
BR1					Y A				T
BR4 BR11					Y W				T
GU112454 GU1									T
GU112483 Fh									T
GU112482 Fh									T
GU112476 GU1					C				T
GU112457 Fh									T
AB510491 Fh									T
KF111618 KF1									T
KF111627 Fh									T
KF111574 KF1									T
GQ121276 Fh									T
KT182304 KT1									T
AJ628039 Fh									T
KT182306 Fh									T
FJ469984 Fh									T
QJ231551 Fh									T
KF111596 KF1									T
KF111620 KF1									T
KF111625Fh									T
KF111622 Fh									T
KF111614 KF1									T
KF111605 Fh		A							T
KF111575 Fh									T
KF111624 Fh									T
KF111600 Fh									T
AJ628034 Fh									T
KJ200621 Fh									T
KF111623 KF1									T
KF111621 Fh									T
AJ628037 Fh					A				T
AJ628036 Fh					A				T
AJ6280353 Fh									T
KT182261 KT1									T
AJ628038 Fh									T
AB300704 Fh									T
JF824674 Fh									T
JF824670 JF8									T
JF824672 JF8									T
GQ121277 Fg	G					A			T
GU112458 GU1	G								T
GU112472 GU1	G								T
GU112464 Fg	G								T
KT182307 Fg									T
KT182295 KT1									T
KT182294 KT1									T
KF687895 Fg	G					A			T
AJ628033 Fsp	G					A			T

Anexo 4

[illegible]

Anexo 4

```

                280      290      300      310
3      TGGTGAATTATAGGGTTTATGTTTATTACTATTGGTGGGG
5      .....
9      .....
17     .....
20     .....
23     .....
26     .....
BR1    .....
BR4|BR11 .....
GU112454|GU1 .....
GU112483|Fh .....
GU112482|Fh .....
GU112476|GU1 .....
GU112457|Fh .....C.....
AB510491|Fh .....
KF111618|KF1 .....
KF111627|Fh .....
KF111574|KF1 .....
GQ121276|Fh .....
KT182304|KT1 .....
AJ628039|Fh .....
KT182306|Fh .....A.....
FJ469984|Fh .....
GQ231551|Fh .....
KF111596|KF1 .....
KF111620|KF1 .....
KF111625Fh .....
KF111622|Fh .....
KF111614|KF1 .....
KF111605|Fh .....
KF111575|Fh .....
KF111624|Fh .....C.....
KF111600|Fh .....C.....
AJ628034|Fh .....
KJ200621|Fh .....
KF111623|KF1 .....
KF111621|Fh .....G.....
AJ628037|Fh .....
AJ628036|Fh .....
AJ6280353|Fh .....
KT182261|KT1 .....
AJ628038|Fh .....
AB300704|Fh .....
JF824674|Fh .....
JF824670|JF8 .....
JF824672|JF8 .....
GQ121277|Fg .....G...G.T...G...G...
GU112458|GU1 .....A...G.T...G...G...
GU112472|GU1 .....A...G.T...G...G...
GU112464|Fg .....A...G.T...G...G...
KT182307|Fg .....A...G.T...G...G...
KT182295|KT1 .....A...G.T...G...G...
KT182294|KT1 .....A...G.T...G...G...
KF687895|Fg .....A.G...G.T...G...G...
AJ628033|Fsp .....A.G...G.T...G...G...

```

Nota:

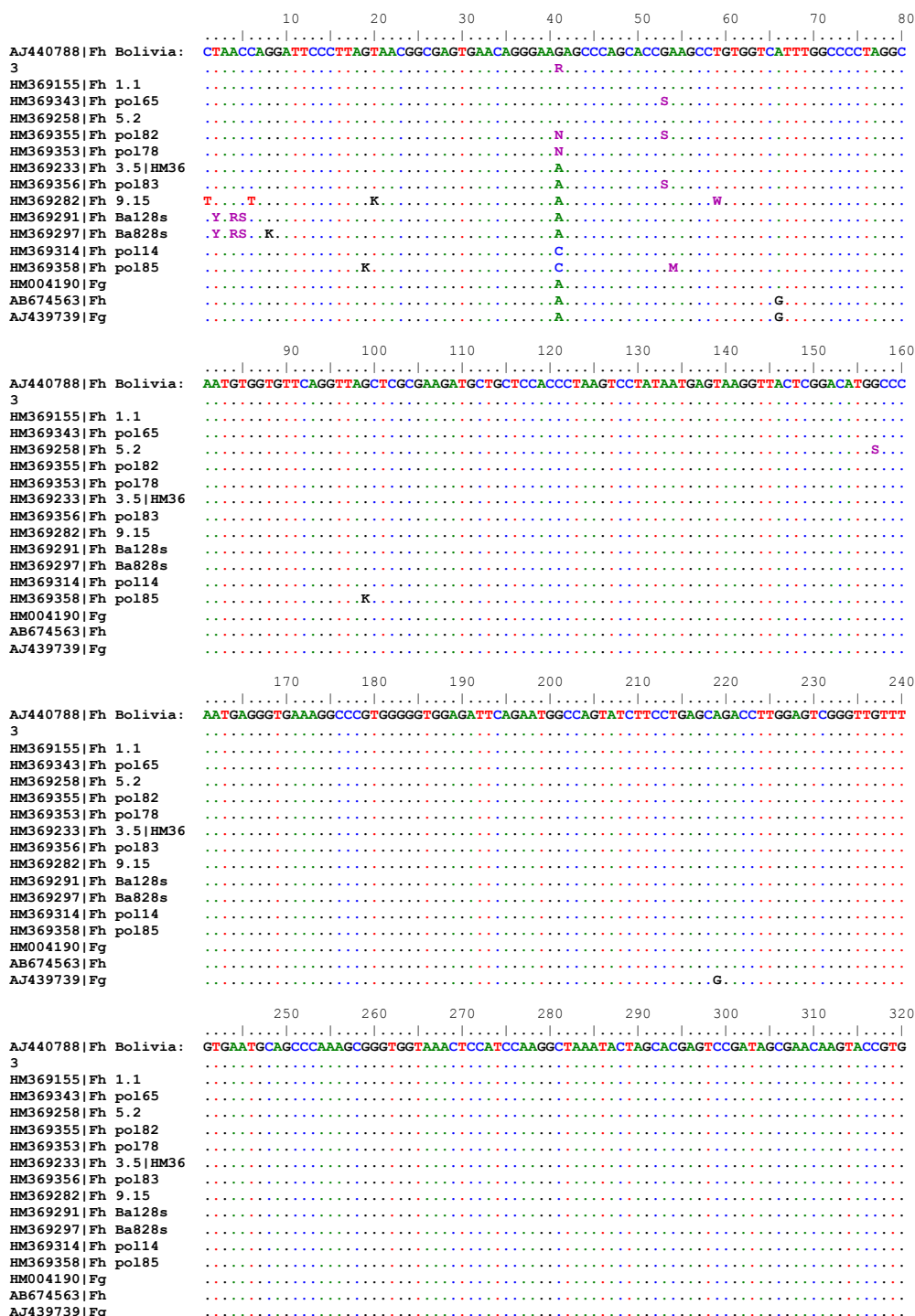
Referências completas das sequências obtidas do GenBank, por ordem do alinhamento:

- GU112454|GU112455|GU112456|GU112469|GU112470|GU112471|Fh
- GU112483|Fh
- GU112482|Fh
- GU112476|GU112477|GU112478|GU112479|GU112480|GU112481|Fh
- GU112457|Fh
- AB510491|Fh
- KF111618|KF111615|KF111629|KF111590|KF111585|KF111587|KF111626|Fh
- KF111627|Fh
- KF111574|KF111578|Fh
- GQ121276|Fh
- KT182304|KT182303|KT182302|KT182301|KT182300|KT182299|KT182298|KT182297|KT182296|GQ231549|GQ231548|Fh
- AJ628039|Fh
- KT182306|Fh
- FJ469984|Fh
- GQ231551|Fh

- KF111596|KF111577|LKF111579|KF111581|Fh
- KF111620|KF111603|KF111607|KF111612|KF111613|KF111601|KF111599|KF111598|KF111597|KF111594|KF111593|KF111591|KF111589|KF111592|KF111586|KF111584|KF111580|KF111582|KF111588|KF111611|KF111628|KF111576|KF111606|KF111608|KF111609|KF111610|KF111619|Fh
- KF111625Fh
- KF111622|Fh
- KF111614|KF111616|KF111617|Fh
- KF111605|Fh
- KF111575|Fh
- KF111624|Fh
- KF111600|Fh
- AJ628034|Fh
- KJ200621|Fh
- KF111623|KF111595|Fh
- KF111621|Fh
- AJ628037|Fh
- AJ628036|Fh
- AJ6280353|Fh
- KT182261|KT182260|KT182259|KT182258|GQ231550|Fh
- AJ628038|Fh
- AB300704|Fh
- JF824674|Fh
- JF824670|JF824671|Fh
- JF824672|JF824673|Fh
- GQ121277|Fg
- GU112458|GU112459|GU112460|GU112461|GU112462|GU112463|GU112465|GU112466|GU112467|GU112468|Fg
- GU112472|GU112473|GU112474|GU112475|Fg
- GU112464|Fg
- KT182307|Fg
- KT182295|KT182288|KT182287|KT182286|KT182285|KT182284|KT182283|KT182282|KT182281|KT182280|KT182279|KT182278|KT182277|KT182276|Fg
- KT182294|KT182293|KT182292|KT182291|KT182290|KT182289|KT182308|Fg
- KF687895|Fg
- AJ628033|Fsp

Anexo 5

Figura A3. Alinhamento das sequências de 28S obtidas durante o decurso deste projeto em relação às sequências depositadas no GenBank, em BioEdit.



Anexo 5

		330	340	350	360	370	380	390	400	
AJ440788 Fh Bolivia:	3	AGGGAAGT	TGAAAAGT	CTTTGAAGAGAGAGT	AAACAGT	CGCTGAAACCGT	TCAGAGGT	AAACAGGT	GGAGTTGA	ACTG
HM369155 Fh 1.1										
HM369343 Fh pol165										
HM369258 Fh 5.2										
HM369355 Fh pol182										
HM369353 Fh pol178										
HM369233 Fh 3.5 HM36										
HM369356 Fh pol183										
HM369282 Fh 9.15										
HM369291 Fh Ba128s										
HM369297 Fh Ba828s										
HM369314 Fh pol114										
HM369358 Fh pol185										
HM004190 Fg										
AB674563 Fh										
AJ439739 Fg										
		410	420	430	440	450	460	470	480	
AJ440788 Fh Bolivia:	3	CAAGCTCT	GAGGATTC	AGCTGGT	GAGTAT	GGCATG	AGCTTGGT	CATATT	GGTTGT	GTGCTCGGGTCTGCTTAGCTGCAGG
HM369155 Fh 1.1										
HM369343 Fh pol165										
HM369258 Fh 5.2										
HM369355 Fh pol182										
HM369353 Fh pol178										
HM369233 Fh 3.5 HM36										
HM369356 Fh pol183										
HM369282 Fh 9.15										
HM369291 Fh Ba128s										
HM369297 Fh Ba828s										
HM369314 Fh pol114										
HM369358 Fh pol185										
HM004190 Fg										
AB674563 Fh										
AJ439739 Fg										
		490	500	510						
AJ440788 Fh Bolivia:	3	TCCCCGCT	TCGGTGGGGAT	GCGCGAAT	CAC					
HM369155 Fh 1.1										
HM369343 Fh pol165										
HM369258 Fh 5.2										
HM369355 Fh pol182										
HM369353 Fh pol178										
HM369233 Fh 3.5 HM36										
HM369356 Fh pol183										
HM369282 Fh 9.15										
HM369291 Fh Ba128s										
HM369297 Fh Ba828s										
HM369314 Fh pol114										
HM369358 Fh pol185										
HM004190 Fg										
AB674563 Fh										
AJ439739 Fg										

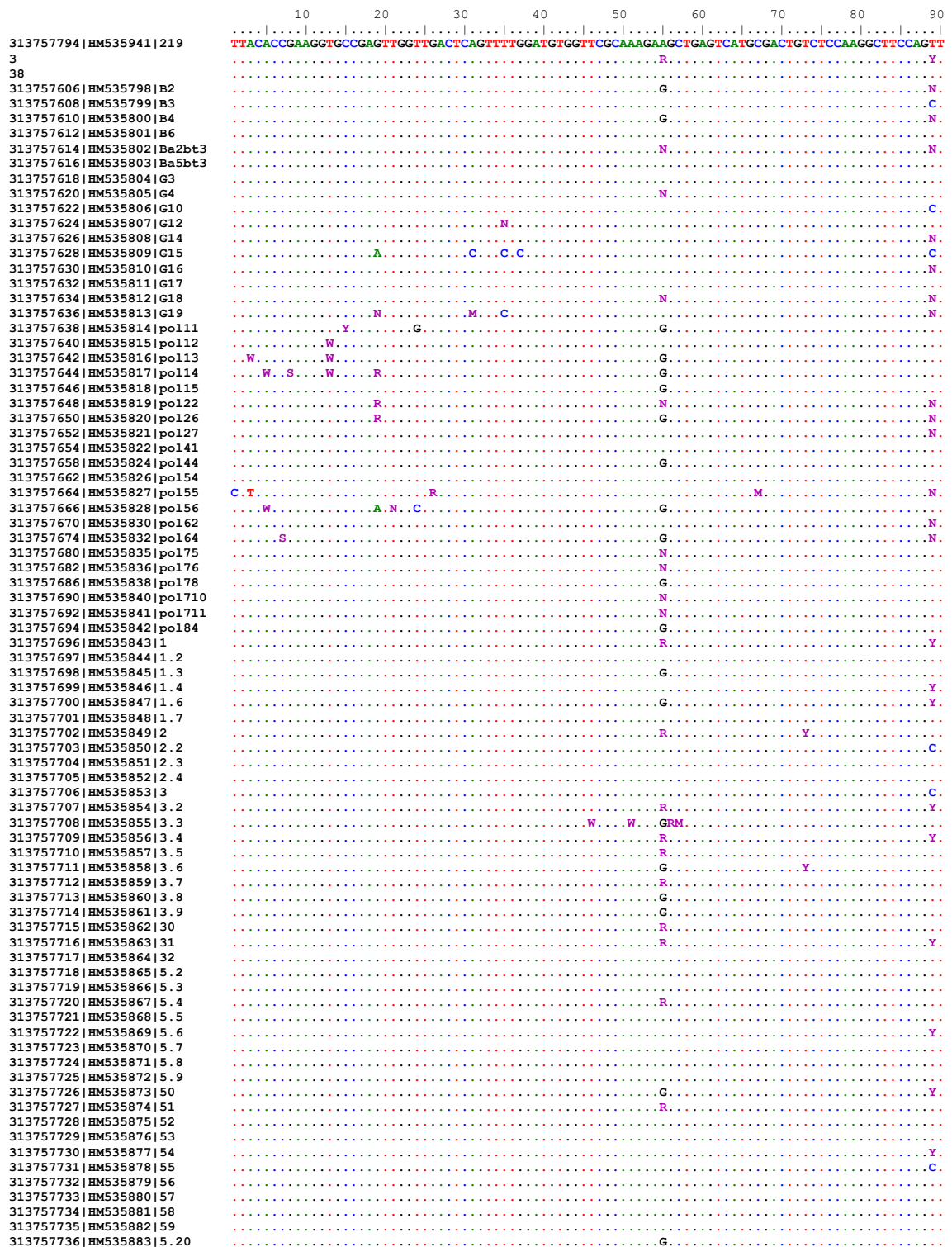
Nota: Referências completas das sequências obtidas do GenBank, por ordem do alinhamento. Fh representa *F. hepatica* e Fg representa *F. gigantica*.

- AJ440788|Fh Bolivia: AJ440788|Fh Bolivia:Northern altiplano, AJ439738|Fh Spain:Valencia, AJ440787|Fh Egypt:Damanhour, AJ440788|Fh Bolivia:Northern altiplano, HM369273|Fh 7.3, HM369264|Fh 5.3, HM369260|Fh 5.24, HM369223|Fh 24.5, HM369232|Fh 3.4, HM369237|Fh 3.9, HM369245|Fh 5.10, HM369266|Fh 5.5, HM369268|Fh 5.7, HM369226|Fh 3.10, HM369156|Fh 1.2, HM369217|Fh 23.8, HM369288|Fh 9.8, HM369200|Fh 21.12, HM369162|Fh 1.8, HM369191|Fh 18.3, HM369194|Fh 2.1, HM369202|Fh 21.2, HM369205|Fh 21.6, HM369210|Fh 23.1, HM369213|Fh 23.4, HM369220|Fh 24.2, HM369236|Fh 3.8, HM369248|Fh 5.13, HM369251|Fh 5.16, HM369252|Fh 5.17, HM369253|Fh 5.18, HM369267|Fh 5.6, HM369269|Fh 5.8, HM369272|Fh 7.2, HM369275|Fh 7.5, HM369278|Fh 9.11, HM369286|Fh 9.5, HM369287|Fh 9.7, HM369337|Fh pol155, HM369249|Fh 5.14, HM369250|Fh 5.15, HM369256|Fh 5.21, HM369261|Fh 5.25, HM369262|Fh 5.26, HM369283|Fh 9.16, HM369211|Fh 23.2, HM369198|Fh 21.10, HM369158|Fh 1.4, HM369185|Fh 17.1, HM369254|Fh 5.19, HM369182|Fh 16.5,

- HM369180|Fh 16.3, HM369179|Fh 16.2, HM369349|Fh pol74, HM369334|Fh pol52, HM369352|Fh pol77, HM369333|Fh pol51, HM369340|Fh pol62, HM369351|Fh pol76, HM369300|Fh F2128s, HM369313|Fh pol13, HM369339|Fh pol61, HM369354|Fh pol79, HM369294|Fh Ba428s, HM369315|Fh pol15, HM369324|Fh pol33, HM369327|Fh pol36, HM369345|Fh pol710, HM369347|Fh pol72, HM369348|Fh pol73 , HM369176|Fh 13.5 , HM369160|Fh 1.6 , HM369255|Fh 5.20 , HM369231|Fh 3.3 , HM369302|Fh F4128s , HM369299|Fh F1128s , LC126083|Fh sheep1
- 3: amostra 3, HM369227|Fh 3.11, HM369238|Fh 31.1, HM369225|Fh 24.7, HM369159|Fh 1.5, HM369186|Fh 17.2, HM369219|Fh 24.1, HM369230|Fh 3.2, HM369285|Fh 9.4, HM369265|Fh 5.4, HM369167|Fh 11.5, HM369174|Fh 13.3, HM369280|Fh 9.1, HM369184|Fh 16.7, HM369214|Fh 23.5
 - HM369233|Fh 3.5: HM369233|Fh 3.5, HM369243|Fh 35.1, HM369263|Fh 5.27, HM369270|Fh 6.1, HM369276|Fh 7.6, HM369242|Fh 34.1, HM369239|Fh 32.1, HM369193|Fh 18.5, HM369157|Fh 1.3, HM369188|Fh 17.4, HM369244|Fh 36.1, HM369247|Fh 5.1, HM369187|Fh 17.3, HM369170|Fh 12.2, HM369203|Fh 21.3, HM369204|Fh 21.4, HM369163|Fh 11.1, HM369164|Fh 11.2, HM369173|Fh 13.2, HM369178|Fh 16.1, HM369183|Fh 16.6, HM369189|Fh 18.1, HM369192|Fh 18.4, HM369195|Fh 2.2, HM369197|Fh 2.4, HM369199|Fh 21.11, HM369208|Fh 21.9, HM369209|Fh 23.10, HM369216|Fh 23.7, HM369222|Fh 24.4, HM369224|Fh 24.6, HM369228|Fh 3.12, HM369229|Fh 3.1, HM369234|Fh 3.6, HM369235|Fh 3.7, HM369240|Fh 32.2, HM369271|Fh 7.1, HM369274|Fh 7.4, HM369277|Fh 9.10, HM369281|Fh 9.14, HM369284|Fh 9.3, HM369298|Fh Ba928s, HM369336|Fh pol54, HM369212|Fh 23.3, HM369296|Fh Ba628s, HM369166|Fh 11.4, HM369175|Fh 13.4, HM369357|Fh pol84, HM369319|Fh pol24, HM369171|Fh 12.4, HM369169|Fh 11.7, HM369321|Fh pol27, HM369325|Fh pol34, HM369331|Fh pol43, HM369332|Fh pol44, HM369341|Fh pol63, HM369344|Fh pol71, HM369350|Fh pol75, HM369323|Fh pol32, HM369292|Fh Ba228s, HM369309|Fh G3 , HM369346|Fh pol711, HM369316|Fh pol21, HM369317|Fh pol22, HM369312|Fh pol12, HM369293|Fh Ba328s, HM369306|Fh G17, HM369329|Fh pol41, HM369330|Fh pol42, HM369165|Fh 11.3, HM369168|Fh 11.6, HM369172|Fh 13.1, HM369177|Fh 13.7, HM369181|Fh 16.4, HM369190|Fh 18.2, HM369196|Fh 2.3, HM369207|Fh 21.8, HM369218|Fh 23.9, HM369241|Fh 33.1, HM369257|Fh 5.22, HM369259|Fh 5.23, HM369335|Fh pol53 , HM369295|Fh Ba528s , HM369290|Fh Ba1028s , JQ999966|Fh 2 |KF791538|Fh , JN811688|Fh , HM369307|Fh G18 , HM369342|Fh pol64 , HM369311|Fh pol11 , HM369320|Fh pol26, HM369322|Fh pol31 , HM369301|Fh F3128s , HM369215|Fh 23.6 , HM369308|Fh G19 , HM369304|Fh G12 , HM369303|Fh G10 , LC126261|Fh sheep3, LC126260|Fh sheep2
 - AB674563|Fh KhuzGoaa1H: AB674563|Fh KhuzGoaa1H, AB674555|Fh KhuzCat1A1 H, HM126479|Fg, HM776945|Fg Bangalore, JF323865|Fg Izatnagar, AB674551|Fg KhuzBufa1G
 - AJ439739|Fg: AJ439739|Fg Cape Verde:Santiago Island, AJ440785|Fg Burkina Faso:Bobo Dioulasso, AJ440786|Fg Egypt:Damanhour, AY222245|Fg |KF791537|Fg , JN811689|Fg , LC120687|Fg goat1, LC076384|Fg , LC120688|Fg goat2

Anexo 6

Figura A4. Alinhamento das sequências de beta-Tubulina 3 obtidas durante o decurso deste projeto (3 e 38) em relação às sequências depositadas no GenBank, em BioEdit.



Anexo 6

313757737 HM535884 5.21	
313757738 HM535885 5.22	R
313757739 HM535886 5.23	R
313757740 HM535887 5.24	R
313757741 HM535888 5.25	
313757742 HM535889 5.26	
313757743 HM535890 5.27	G
313757744 HM535891 7	
313757745 HM535892 7.2	G
313757746 HM535893 7.4	G
313757747 HM535894 7.6	
313757748 HM535895 9	R
313757749 HM535896 9.3	G
313757750 HM535897 9.4	
313757751 HM535898 9.5	G
313757752 HM535899 9.7	R
313757753 HM535900 9.8	R
313757754 HM535901 91	G
313757755 HM535902 92	R
313757756 HM535903 94	
313757757 HM535904 95	G
313757758 HM535905 96	
313757759 HM535906 11	R
313757760 HM535907 11.3	G
313757761 HM535908 11.4	R
313757762 HM535909 11.5	
313757763 HM535910 11.6	G
313757764 HM535911 11.7	R
313757765 HM535912 12.2	
313757766 HM535913 12.4	G
313757767 HM535914 13.2	
313757768 HM535915 13.3	G
313757769 HM535916 13.4	
313757770 HM535917 13.5	
313757771 HM535918 13.7	G
313757772 HM535919 16	R
313757773 HM535920 16.2	G
313757774 HM535921 16.3	
313757775 HM535922 16.4	
313757776 HM535923 16.5	
313757777 HM535924 16.6	R
313757778 HM535925 16.7	
313757779 HM535926 17	R
313757780 HM535927 17.2	G
313757781 HM535928 17.4	G
313757782 HM535929 18	
313757783 HM535930 18.2	G
313757784 HM535931 18.3	
313757785 HM535932 18.4	G
313757786 HM535933 18.5	
313757787 HM535934 212	G
313757788 HM535935 213	
313757789 HM535936 214	G
313757790 HM535937 215	
313757791 HM535938 216	G
313757792 HM535939 217	
313757793 HM535940 218	
313757795 HM535942 2110	G
313757796 HM535943 2111	G
313757797 HM535944 2112	G
313757798 HM535945 224	R
313757799 HM535946 225	G
313757800 HM535947 24	G
313757801 HM535948 24.2	
313757802 HM535949 24.3	G
313757803 HM535950 24.4	
313757804 HM535951 24.5	G
313757805 HM535952 24.6	R
313757806 HM535953 24.7	R
313757807 HM535954 31	
313757808 HM535955 31.4	G
313757809 HM535956 32	G
313757810 HM535957 32.2	
313757811 HM535958 33	G
313757812 HM535959 33.2	
313757813 HM535960 34	
313757814 HM535961 35	Y
313757815 HM535962 36	M

Anexo 6

	100	110	120	130	140	150	160	170	180
313757794 HM535941 219	G	A	C	T	C	A	T	T	C
3									
38									
313757606 HM535798 B2									
313757608 HM535799 B3									
313757610 HM535800 B4									
313757612 HM535801 B6									
313757614 HM535802 Ba2bt3									
313757616 HM535803 Ba5bt3									
313757618 HM535804 G3									
313757620 HM535805 G4									
313757622 HM535806 G10									
313757624 HM535807 G12									
313757626 HM535808 G14									
313757628 HM535809 G15									
313757630 HM535810 G16									
313757632 HM535811 G17									
313757634 HM535812 G18									
313757636 HM535813 G19									
313757638 HM535814 pol11									
313757640 HM535815 pol12									
313757642 HM535816 pol13									
313757644 HM535817 pol14									
313757646 HM535818 pol15									
313757648 HM535819 pol22									
313757650 HM535820 pol26									
313757652 HM535821 pol27									
313757654 HM535822 pol41									
313757658 HM535824 pol44									
313757662 HM535826 pol54									
313757664 HM535827 pol55									
313757666 HM535828 pol56									
313757670 HM535830 pol62									
313757674 HM535832 pol64									
313757680 HM535835 pol75									
313757682 HM535836 pol76									
313757686 HM535838 pol78									
313757690 HM535840 pol710									
313757692 HM535841 pol711									
313757694 HM535842 pol84									
313757696 HM535843 1									
313757697 HM535844 1.2									
313757698 HM535845 1.3									
313757699 HM535846 1.4									
313757700 HM535847 1.6									
313757701 HM535848 1.7									
313757702 HM535849 2									
313757703 HM535850 2.2									
313757704 HM535851 2.3									
313757705 HM535852 2.4									
313757706 HM535853 3									
313757707 HM535854 3.2									
313757708 HM535855 3.3									
313757709 HM535856 3.4									
313757710 HM535857 3.5									
313757711 HM535858 3.6									
313757712 HM535859 3.7									
313757713 HM535860 3.8									
313757714 HM535861 3.9									
313757715 HM535862 30									
313757716 HM535863 31									
313757717 HM535864 32									
313757718 HM535865 5.2									
313757719 HM535866 5.3									
313757720 HM535867 5.4									
313757721 HM535868 5.5									
313757722 HM535869 5.6									
313757723 HM535870 5.7									
313757724 HM535871 5.8									
313757725 HM535872 5.9									
313757726 HM535873 50									
313757727 HM535874 51									
313757728 HM535875 52									
313757729 HM535876 53									
313757730 HM535877 54									
313757731 HM535878 55									
313757732 HM535879 56									
313757733 HM535880 57									
313757734 HM535881 58									
313757735 HM535882 59									
313757736 HM535883 5.20									
313757737 HM535884 5.21									
313757738 HM535885 5.22									
313757739 HM535886 5.23									
313757740 HM535887 5.24									
313757741 HM535888 5.25									
313757742 HM535889 5.26									
313757743 HM535890 5.27									
313757744 HM535891 7									
313757745 HM535892 7.2									
313757746 HM535893 7.4									
313757747 HM535894 7.6									
313757748 HM535895 9									
313757749 HM535896 9.3									
313757750 HM535897 9.4									
313757751 HM535898 9.5									

Anexo 6

313757752 HM535899 9.7Y.....
313757753 HM535900 9.8Y.....
313757754 HM535901 91
313757755 HM535902 92
313757756 HM535903 94
313757757 HM535904 95
313757758 HM535905 96Y.....
313757759 HM535906 11
313757760 HM535907 11.3Y.....
313757761 HM535908 11.4
313757762 HM535909 11.5
313757763 HM535910 11.6Y.....
313757764 HM535911 11.7Y.....
313757765 HM535912 12.2
313757766 HM535913 12.4
313757767 HM535914 13.2Y.....
313757768 HM535915 13.3
313757769 HM535916 13.4
313757770 HM535917 13.5
313757771 HM535918 13.7
313757772 HM535919 16
313757773 HM535920 16.2
313757774 HM535921 16.3
313757775 HM535922 16.4
313757776 HM535923 16.5
313757777 HM535924 16.6
313757778 HM535925 16.7
313757779 HM535926 17
313757780 HM535927 17.2
313757781 HM535928 17.4
313757782 HM535929 18
313757783 HM535930 18.2
313757784 HM535931 18.3
313757785 HM535932 18.4
313757786 HM535933 18.5
313757787 HM535934 212
313757788 HM535935 213
313757789 HM535936 214
313757790 HM535937 215
313757791 HM535938 216
313757792 HM535939 217
313757793 HM535940 218
313757795 HM535942 2110
313757796 HM535943 2111
313757797 HM535944 2112
313757798 HM535945 224
313757799 HM535946 225
313757800 HM535947 24Y.....
313757801 HM535948 24.2
313757802 HM535949 24.3
313757803 HM535950 24.4
313757804 HM535951 24.5Y.....
313757805 HM535952 24.6
313757806 HM535953 24.7Y.....
313757807 HM535954 31
313757808 HM535955 31.4
313757809 HM535956 32
313757810 HM535957 32.2
313757811 HM535958 33
313757812 HM535959 33.2
313757813 HM535960 34
313757814 HM535961 35
313757815 HM535962 36

Anexo 6

		190	200	210	220	230	240	250	260	270																				
313757794 HM535941 219		CAC	TTT	CTC	CGT	GGT	CCCC	TAC	CCCA	AGGTAT	GTG	TCA	AGCC	AGGT	CCCA	AAATAT	GTG	TCA	TCAT	CAATAT	CTG	TTT	CTG	TTT	AGGT	TAT	CCG	AC	CACC	G
3																														
38																														
313757606 HM535798 B2																														
313757608 HM535799 B3																														
313757610 HM535800 B4																														
313757612 HM535801 B6																														
313757614 HM535802 Ba2bt3																														
313757616 HM535803 Ba5bt3																														
313757618 HM535804 G3																														
313757620 HM535805 G4																														
313757622 HM535806 G10																														
313757624 HM535807 G12																														
313757626 HM535808 G14																														
313757628 HM535809 G15																														
313757630 HM535810 G16																														
313757632 HM535811 G17																														
313757634 HM535812 G18																														
313757636 HM535813 G19																														
313757638 HM535814 pol11																														
313757640 HM535815 pol12																														
313757642 HM535816 pol13																														
313757644 HM535817 pol14																														
313757646 HM535818 pol15																														
313757648 HM535819 pol22																														
313757650 HM535820 pol26																														
313757652 HM535821 pol27																														
313757654 HM535822 pol141																														
313757658 HM535824 pol144																														
313757662 HM535826 pol154																														
313757664 HM535827 pol155																														
313757666 HM535828 pol156																														
313757670 HM535830 pol162																														
313757674 HM535832 pol164																														
313757680 HM535835 pol175																														
313757682 HM535836 pol176																														
313757686 HM535838 pol178																														
313757690 HM535840 pol1710																														
313757692 HM535841 pol1711																														
313757694 HM535842 pol184																														
313757696 HM535843 1																														
313757697 HM535844 1.2																														
313757698 HM535845 1.3																														
313757699 HM535846 1.4																														
313757700 HM535847 1.6																														
313757701 HM535848 1.7																														
313757702 HM535849 2																														
313757703 HM535850 2.2																														
313757704 HM535851 2.3																														
313757705 HM535852 2.4																														
313757706 HM535853 3																														
313757707 HM535854 3.2																														
313757708 HM535855 3.3																														
313757709 HM535856 3.4																														
313757710 HM535857 3.5																														
313757711 HM535858 3.6																														
313757712 HM535859 3.7																														
313757713 HM535860 3.8																														
313757714 HM535861 3.9																														
313757715 HM535862 30																														
313757716 HM535863 31																														
313757717 HM535864 32																														
313757718 HM535865 5.2																														
313757719 HM535866 5.3																														
313757720 HM535867 5.4																														
313757721 HM535868 5.5																														
313757722 HM535869 5.6																														
313757723 HM535870 5.7																														
313757724 HM535871 5.8																														
313757725 HM535872 5.9																														
313757726 HM535873 50																														
313757727 HM535874 51																														
313757728 HM535875 52																														
313757729 HM535876 53																														
313757730 HM535877 54																														
313757731 HM535878 55																														
313757732 HM535879 56																														
313757733 HM535880 57																														
313757734 HM535881 58																														
313757735 HM535882 59																														
313757736 HM535883 5.20																														

Anexo 6

313757752 HM535899 9.7R.....YR.....
313757753 HM535900 9.8R.....W.....Y...WTCA.....
313757754 HM535901 91R.....Y.....Y.....
313757755 HM535902 92R.....Y.....Y.....
313757756 HM535903 94R.....Y...TC.....
313757757 HM535904 95R.....Y.....Y.....
313757758 HM535905 96R.....Y.....Y.....
313757759 HM535906 111R..M.....Y...Y.....
313757760 HM535907 11.3R.....Y...TC.....
313757761 HM535908 11.4R.....Y...TY.....
313757762 HM535909 11.5R.....Y.....Y.....
313757763 HM535910 11.6R.....T...WTCR.....
313757764 HM535911 11.7R..C.....W.....Y...YR.....
313757765 HM535912 12.2R.....Y.....Y.....
313757766 HM535913 12.4R.....Y.....Y.....
313757767 HM535914 13.2C.....Y.....Y.....
313757768 HM535915 13.3C.....Y.....Y.....
313757769 HM535916 13.4R.....Y...TC.....
313757770 HM535917 13.5R.....Y.....Y.....
313757771 HM535918 13.7R..M.....Y...TC.....
313757772 HM535919 16M.....Y...TY.....
313757773 HM535920 16.2M.....Y.....Y.....
313757774 HM535921 16.3R.....Y...TC.....
313757775 HM535922 16.4R.....Y.....Y.....
313757776 HM535923 16.5R.....Y.....Y.....
313757777 HM535924 16.6R..C.....Y...YR.....
313757778 HM535925 16.7R.....Y.....Y.....
313757779 HM535926 17R.....M.....Y...TC.....
313757780 HM535927 17.2R.....Y.....Y.....
313757781 HM535928 17.4R.....Y.....Y.....
313757782 HM535929 18R.....Y.....Y.....
313757783 HM535930 18.2 31R.....Y.....Y.....
313757784 HM535931 18.3R.....Y.....Y.....
313757785 HM535932 18.4R.....Y.....Y.....
313757786 HM535933 18.5M.....Y...TY.....
313757787 HM535934 212R.....Y.....Y.....
313757788 HM535935 213R.....Y.....Y.....
313757789 HM535936 214R.....Y.....Y.....
313757790 HM535937 215R.....Y.....Y.....
313757791 HM535938 216R.....Y...TCR.....
313757792 HM535939 217R.....Y.....Y.....
313757793 HM535940 218R.....Y...TC.....
313757795 HM535942 2110R.....Y...TY.....
313757796 HM535943 2111R.....Y.....Y.....
313757797 HM535944 2112R.....Y...Y.....
313757798 HM535945 224R.....Y...TY.....
313757799 HM535946 225R.....Y.....Y.....
313757800 HM535947 24R.....Y...TC.....
313757801 HM535948 24.2R.....Y.....Y.....
313757802 HM535949 24.3R..C.....Y.....Y.....
313757803 HM535950 24.4R.....Y...TC.....
313757804 HM535951 24.5R..M.....Y.....Y.....
313757805 HM535952 24.6R.....Y.....Y.....
313757806 HM535953 24.7R.....Y...TCW.....
313757807 HM535954 31R.....Y...TY.....
313757808 HM535955 31.4R.....Y.....Y.....
313757809 HM535956 32R.....Y...TC.....
313757810 HM535957 32.2A.....Y.....Y.....
313757811 HM535958 33R.....Y.....Y.....
313757812 HM535959 33.2R.....Y...TA.....
313757813 HM535960 34A.....W.....Y...TC.....
313757814 HM535961 35R.....W.....Y.....Y.....
313757815 HM535962 36R.....A.....W.....Y...WTYR.....

Anexo 6

	280	290	300	310	320	330	340	350	360
313757794 HM535941 219	TTGTGGAACCATATATGCTACCCCTATCCG	TACATCAGTTGGTCGAGAACACGGATGAGACGTATTGCATCGACAACGAAGCTCTATATG							
3			Y						
38				R					
313757606 HM535798 B2			T						
313757608 HM535799 B3									
313757610 HM535800 B4			T						
313757612 HM535801 B6			T						
313757614 HM535802 Ba2bt3			N						
313757616 HM535803 Ba5bt3									
313757618 HM535804 G3									
313757620 HM535805 G4			N						
313757622 HM535806 G10									
313757624 HM535807 G12									
313757626 HM535808 G14									
313757628 HM535809 G15									
313757630 HM535810 G16									
313757632 HM535811 G17									
313757634 HM535812 G18			N						
313757636 HM535813 G19									
313757638 HM535814 pol11			T						
313757640 HM535815 pol12			T						
313757642 HM535816 pol13			T						
313757644 HM535817 pol14			T						
313757646 HM535818 pol15			T						
313757648 HM535819 pol22			N						
313757650 HM535820 pol26			T						
313757652 HM535821 pol27			T						
313757654 HM535822 pol41			T						
313757658 HM535824 pol44			T						
313757662 HM535826 pol54			T						
313757664 HM535827 pol55			T						
313757666 HM535828 pol56			T						
313757670 HM535830 pol62			N						
313757674 HM535832 pol64			T						
313757680 HM535835 pol75			N	N					
313757682 HM535836 pol76			N	N					
313757686 HM535838 pol78			T						
313757690 HM535840 pol710			N	N					
313757692 HM535841 pol711			T						
313757694 HM535842 pol84			T						
313757696 HM535843 1			Y						
313757697 HM535844 1.2									
313757698 HM535845 1.3			T						
313757699 HM535846 1.4									
313757700 HM535847 1.6			T						
313757701 HM535848 1.7									
313757702 HM535849 2			T						
313757703 HM535850 2.2			T						
313757704 HM535851 2.3			T						
313757705 HM535852 2.4			Y						
313757706 HM535853 3									
313757707 HM535854 3.2			T						
313757708 HM535855 3.3									
313757709 HM535856 3.4			T						
313757710 HM535857 3.5			T						
313757711 HM535858 3.6			T						
313757712 HM535859 3.7			Y						
313757713 HM535860 3.8			T						
313757714 HM535861 3.9			T						
313757715 HM535862 30			T						
313757716 HM535863 31			T						
313757717 HM535864 32			T						
313757718 HM535865 5.2									
313757719 HM535866 5.3									
313757720 HM535867 5.4			T						
313757721 HM535868 5.5									
313757722 HM535869 5.6									
313757723 HM535870 5.7									
313757724 HM535871 5.8									
313757725 HM535872 5.9									
313757726 HM535873 50			Y						
313757727 HM535874 51									
313757728 HM535875 52									
313757729 HM535876 53									
313757730 HM535877 54									
313757731 HM535878 55									
313757732 HM535879 56									
313757733 HM535880 57				R					
313757734 HM535881 58									
313757735 HM535882 59									
313757736 HM535883 5.20			T						
313757737 HM535884 5.21									
313757738 HM535885 5.22			T						
313757739 HM535886 5.23			T						
313757740 HM535887 5.24			T						
313757741 HM535888 5.25									
313757742 HM535889 5.26									
313757743 HM535890 5.27			T						
313757744 HM535891 7			T						
313757745 HM535892 7.2			T						
313757746 HM535893 7.4			T						
313757747 HM535894 7.6			T						
313757748 HM535895 9			T						
313757749 HM535896 9.3			T						
313757750 HM535897 9.4			T						
313757751 HM535898 9.5			T						

Anexo 6

313757752 HM535899 9.7	T
313757753 HM535900 9.8	T
313757754 HM535901 91	T
313757755 HM535902 92	T
313757756 HM535903 94	
313757757 HM535904 95	T
313757758 HM535905 96	
313757759 HM535906 11	T
313757760 HM535907 11.3	T
313757761 HM535908 11.4	T
313757762 HM535909 11.5	T
313757763 HM535910 11.6	Y
313757764 HM535911 11.7	T
313757765 HM535912 12.2	
313757766 HM535913 12.4	Y
313757767 HM535914 13.2	T
313757768 HM535915 13.3	T
313757769 HM535916 13.4	T
313757770 HM535917 13.5	T
313757771 HM535918 13.7	T
313757772 HM535919 16	T
313757773 HM535920 16.2	T
313757774 HM535921 16.3	T
313757775 HM535922 16.4	T
313757776 HM535923 16.5	T
313757777 HM535924 16.6	T
313757778 HM535925 16.7	T
313757779 HM535926 17	T
313757780 HM535927 17.2	T
313757781 HM535928 17.4	T
313757782 HM535929 18	T
313757783 HM535930 18.2	T
313757784 HM535931 18.3	T
313757785 HM535932 18.4	T
313757786 HM535933 18.5	T
313757787 HM535934 212	T
313757788 HM535935 213	A G
313757789 HM535936 214	T
313757790 HM535937 215	
313757791 HM535938 216	T
313757792 HM535939 217	T
313757793 HM535940 218	T
313757795 HM535942 2110	T
313757796 HM535943 2111	T
313757797 HM535944 2112	T
313757798 HM535945 224	T
313757799 HM535946 225	T
313757800 HM535947 24	Y
313757801 HM535948 24.2	A R
313757802 HM535949 24.3	T
313757803 HM535950 24.4	K
313757804 HM535951 24.5	T
313757805 HM535952 24.6	T
313757806 HM535953 24.7	T
313757807 HM535954 31	T
313757808 HM535955 31.4	T
313757809 HM535956 32	T
313757810 HM535957 32.2	
313757811 HM535958 33	T
313757812 HM535959 33.2	
313757813 HM535960 34	T
313757814 HM535961 35	T
313757815 HM535962 36	T

Anexo 6

	370	380	390	400	410	420	430	440	450
313757794 HM535941 219	ATATCTGCTTCCGCACCTTGAAACTGACCACGCCAACCTACGGTGATT	TTAAACCATTTGGTGAGTGCCACCATGTCCGGTGTGACAACCTT							
3	Y.Y.				R.Y.	Y	Y		
38	Y.Y.				R.Y.	Y	Y		
313757606 HM535798 B2									
313757608 HM535799 B3							T		
313757610 HM535800 B4									
313757612 HM535801 B6	N.N.								
313757614 HM535802 Ba2bt3	T.T.			G			N		
313757616 HM535803 Ba5bt3	T.N.			G					
313757618 HM535804 G3	N.N.								
313757620 HM535805 G4	T.N.								
313757622 HM535806 G10	T.T.			G			N		
313757624 HM535807 G12	N.N.								
313757626 HM535808 G14	T.N.								
313757628 HM535809 G15	T.T.			G	C		T		
313757630 HM535810 G16	N.N.								
313757632 HM535811 G17	T.T.			G	N		N		
313757634 HM535812 G18	N.N.								
313757636 HM535813 G19	T.T.			N					
313757638 HM535814 pol11				N			Y		
313757640 HM535815 pol12									
313757642 HM535816 pol13									
313757644 HM535817 pol14									
313757646 HM535818 pol15									
313757648 HM535819 pol22	T.N.								
313757650 HM535820 pol26	N								
313757652 HM535821 pol27	T.T.								
313757654 HM535822 pol41									
313757658 HM535824 pol44									
313757662 HM535826 pol54									
313757664 HM535827 pol55	S								
313757666 HM535828 pol56									
313757670 HM535830 pol62									
313757674 HM535832 pol64									
313757680 HM535835 pol175			N						
313757682 HM535836 pol176			N						
313757686 HM535838 pol178									
313757690 HM535840 pol1710									
313757692 HM535841 pol1711									
313757694 HM535842 pol184									
313757696 HM535843 1	T.Y.								
313757697 HM535844 1.2	Y.Y.			R					
313757698 HM535845 1.3	Y.Y.								
313757699 HM535846 1.4	Y			G					
313757700 HM535847 1.6	T.Y.			R					
313757701 HM535848 1.7	T.Y.								
313757702 HM535849 2	Y.Y.			R			Y		
313757703 HM535850 2.2	Y.Y.			R			Y		
313757704 HM535851 2.3	Y.Y.			R	Y				
313757705 HM535852 2.4	T.T.	A							
313757706 HM535853 3							T		
313757707 HM535854 3.2	Y.Y.			R					
313757708 HM535855 3.3									
313757709 HM535856 3.4	Y.Y.			R					
313757710 HM535857 3.5	T.Y.								
313757711 HM535858 3.6	T.Y.			R					
313757712 HM535859 3.7	T.Y.								
313757713 HM535860 3.8	T.Y.						Y		
313757714 HM535861 3.9	T.Y.								
313757715 HM535862 30	Y.Y.								
313757716 HM535863 31	Y.Y.								
313757717 HM535864 32	T.T.						M		
313757718 HM535865 5.2	Y.Y.			R					
313757719 HM535866 5.3	Y.Y.	Y							
313757720 HM535867 5.4	T.Y.						Y		
313757721 HM535868 5.5	Y.Y.			R					
313757722 HM535869 5.6	Y.Y.			R	Y				
313757723 HM535870 5.7	T.Y.		Y				Y		
313757724 HM535871 5.8	T.Y.			R					
313757725 HM535872 5.9	T.Y.								
313757726 HM535873 50	T								
313757727 HM535874 51	Y.Y.			R					
313757728 HM535875 52	T	Y							
313757729 HM535876 53	Y					Y			
313757730 HM535877 54	Y			R					
313757731 HM535878 55	T			G					
313757732 HM535879 56	T.Y.				Y				
313757733 HM535880 57	Y			R					
313757734 HM535881 58	Y.Y.	Y		R					
313757735 HM535882 59	Y			R					
313757736 HM535883 5.20	Y			R					
313757737 HM535884 5.21	Y.Y.		G	Y					
313757738 HM535885 5.22	T.Y.								
313757739 HM535886 5.23	T.Y.				Y		Y		
313757740 HM535887 5.24	Y.Y.			R					
313757741 HM535888 5.25	Y.Y.			R	Y				
313757742 HM535889 5.26	Y	Y							
313757743 HM535890 5.27	Y.Y.			R					
313757744 HM535891 7	T.T.								
313757745 HM535892 7.2	Y								
313757746 HM535893 7.4	Y.Y.								
313757747 HM535894 7.6	T.T.								
313757748 HM535895 9	Y						Y		
313757749 HM535896 9.3	T.Y.								
313757750 HM535897 9.4	Y								
313757751 HM535898 9.5	T.Y.			R			Y		

Anexo 6

313757752 HM535899 9.7	
313757753 HM535900 9.8	Y.Y.
313757754 HM535901 91	Y.R
313757755 HM535902 92	Y.Y.
313757756 HM535903 94	Y.Y.
313757757 HM535904 95	Y.Y.
313757758 HM535905 96	Y.Y.
313757759 HM535906 11	T.Y
313757760 HM535907 11.3	Y.Y.
313757761 HM535908 11.4	Y.Y.
313757762 HM535909 11.5	
313757763 HM535910 11.6	T.
313757764 HM535911 11.7	Y.R
313757765 HM535912 12.2	Y.Y.R
313757766 HM535913 12.4	Y.R
313757767 HM535914 13.2	T.T.
313757768 HM535915 13.3	Y.Y.
313757769 HM535916 13.4	T.T.
313757770 HM535917 13.5	
313757771 HM535918 13.7	Y.R
313757772 HM535919 16	T.T.R
313757773 HM535920 16.2	
313757774 HM535921 16.3	T.T.
313757775 HM535922 16.4	T.T.
313757776 HM535923 16.5	
313757777 HM535924 16.6	Y.R
313757778 HM535925 16.7	T.T.R
313757779 HM535926 17	T.T.Y
313757780 HM535927 17.2	
313757781 HM535928 17.4	Y.
313757782 HM535929 18	
313757783 HM535930 18.2	
313757784 HM535931 18.3	T.T.R
313757785 HM535932 18.4	Y.
313757786 HM535933 18.5	
313757787 HM535934 212	
313757788 HM535935 213	T.
313757789 HM535936 214	Y.
313757790 HM535937 215	T.T.
313757791 HM535938 216	Y.
313757792 HM535939 217	T.T.
313757793 HM535940 218	T.T.
313757795 HM535942 2110	Y.
313757796 HM535943 2111	T.
313757797 HM535944 2112	Y.
313757798 HM535945 224	Y.Y.
313757799 HM535946 225	
313757800 HM535947 24	T.T.
313757801 HM535948 24.2	Y.Y.T.R
313757802 HM535949 24.3	Y.Y.R
313757803 HM535950 24.4	Y.Y.
313757804 HM535951 24.5	Y.Y.R
313757805 HM535952 24.6	Y.Y.Y
313757806 HM535953 24.7	Y.Y.
313757807 HM535954 31	T.T.A
313757808 HM535955 31.4	T.T.
313757809 HM535956 32	Y.
313757810 HM535957 32.2	T.
313757811 HM535958 33	Y.Y.
313757812 HM535959 33.2	
313757813 HM535960 34	Y.R
313757814 HM535961 35	T.Y.R
313757815 HM535962 36	Y.

Anexo 6

	460	470	480	490	500	510	520	530	540
313757794 HM535941 219	G	T	C	T	G	C	T	G	T
3	T	C	T	G	C	T	G	T	C
38	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757606 HM535798 B2	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757608 HM535799 B3	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757610 HM535800 B4	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757612 HM535801 B6	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757614 HM535802 Ba2bt3	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757616 HM535803 Ba5bt3	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757618 HM535804 G3	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757620 HM535805 G4	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757622 HM535806 G10	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757624 HM535807 G12	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757626 HM535808 G14	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757628 HM535809 G15	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757630 HM535810 G16	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757632 HM535811 G17	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757634 HM535812 G18	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757636 HM535813 G19	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757638 HM535814 pol11	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757640 HM535815 pol12	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757642 HM535816 pol13	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757644 HM535817 pol14	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757646 HM535818 pol15	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757648 HM535819 pol22	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757650 HM535820 pol26	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757652 HM535821 pol27	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757654 HM535822 pol141	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757658 HM535824 pol144	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757662 HM535826 pol154	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757664 HM535827 pol155	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757666 HM535828 pol156	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757670 HM535830 pol162	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757674 HM535832 pol164	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757680 HM535835 pol175	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757682 HM535836 pol176	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757686 HM535838 pol178	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757690 HM535840 pol1710	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757692 HM535841 pol1711	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757694 HM535842 pol184	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757696 HM535843 1	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757697 HM535844 1.2	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757698 HM535845 1.3	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757699 HM535846 1.4	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757700 HM535847 1.6	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757701 HM535848 1.7	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757702 HM535849 2	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757703 HM535850 2.2	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757704 HM535851 2.3	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757705 HM535852 2.4	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757706 HM535853 3	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757707 HM535854 3.2	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757708 HM535855 3.3	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757709 HM535856 3.4	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757710 HM535857 3.5	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757711 HM535858 3.6	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757712 HM535859 3.7	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757713 HM535860 3.8	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757714 HM535861 3.9	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757715 HM535862 30	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757716 HM535863 31	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757717 HM535864 32	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757718 HM535865 5.2	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757719 HM535866 5.3	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757720 HM535867 5.4	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757721 HM535868 5.5	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757722 HM535869 5.6	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757723 HM535870 5.7	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757724 HM535871 5.8	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757725 HM535872 5.9	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757726 HM535873 50	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757727 HM535874 51	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757728 HM535875 52	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757729 HM535876 53	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757730 HM535877 54	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757731 HM535878 55	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757732 HM535879 56	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757733 HM535880 57	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757734 HM535881 58	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757735 HM535882 59	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757736 HM535883 5.20	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757737 HM535884 5.21	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757738 HM535885 5.22	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757739 HM535886 5.23	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757740 HM535887 5.24	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757741 HM535888 5.25	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757742 HM535889 5.26	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757743 HM535890 5.27	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757744 HM535891 7	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757745 HM535892 7.2	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757746 HM535893 7.4	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757747 HM535894 7.6	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757748 HM535895 9	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757749 HM535896 9.3	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757750 HM535897 9.4	T	C	T	G	C	T	G	T	C
313757751 HM535898 9.5	T	C	T	G	C	T	G	T	C

Anexo 6

313757752 HM535899 9.7C.....
313757753 HM535900 9.8C.....
313757754 HM535901 91Y.....C.....
313757755 HM535902 92Y.....C.....
313757756 HM535903 94W.....
313757757 HM535904 95C.....
313757758 HM535905 96Y.....C.....
313757759 HM535906 11Y.....C.....
313757760 HM535907 11.3C.....
313757761 HM535908 11.4C.....
313757762 HM535909 11.5C.....
313757763 HM535910 11.6C.....
313757764 HM535911 11.7Y.....Y.....
313757765 HM535912 12.2A.....
313757766 HM535913 12.4C.....
313757767 HM535914 13.2W.....
313757768 HM535915 13.3Y.....C.....
313757769 HM535916 13.4Y.....
313757770 HM535917 13.5Y.....
313757771 HM535918 13.7Y.....Y.....
313757772 HM535919 16Y.....C.....
313757773 HM535920 16.2Y.....C.....
313757774 HM535921 16.3Y.....
313757775 HM535922 16.4Y.....Y.....
313757776 HM535923 16.5Y.....Y.....
313757777 HM535924 16.6C.....C.....
313757778 HM535925 16.7
313757779 HM535926 17
313757780 HM535927 17.2C.....
313757781 HM535928 17.4C.....
313757782 HM535929 18C.....
313757783 HM535930 18.2C.....
313757784 HM535931 18.3Y.....C.....
313757785 HM535932 18.4Y.....W.....
313757786 HM535933 18.5C.....
313757787 HM535934 212A.....
313757788 HM535935 213C.....
313757789 HM535936 214C.....
313757790 HM535937 215C.....
313757791 HM535938 216C.....
313757792 HM535939 217
313757793 HM535940 218
313757795 HM535942 2110C.....
313757796 HM535943 2111C.....
313757797 HM535944 2112C.....
313757798 HM535945 224Y.....
313757799 HM535946 225
313757800 HM535947 24A.....
313757801 HM535948 24.2C.....C.....
313757802 HM535949 24.3Y.....M.....
313757803 HM535950 24.4Y.....C.....
313757804 HM535951 24.5Y.....C.....
313757805 HM535952 24.6Y.....C.....
313757806 HM535953 24.7C.....
313757807 HM535954 31C.....
313757808 HM535955 31.4C.....
313757809 HM535956 32C.....
313757810 HM535957 32.2A.....
313757811 HM535958 33C.....
313757812 HM535959 33.2
313757813 HM535960 34
313757814 HM535961 35
313757815 HM535962 36

Anexo 6

		550	560	570	580	590	600	610	620	630
313757794 HM535941 219	3	GTTT	TGCTCCCACTAACCAGTCGAGGTAGCCAAACAATACCGTGTCTGACTGTGCTGAGTTGACTCAACAAATGTTTGAGCGGAAGAAC							
38				Y						
						Y	R			
313757606 HM535798 B2										
313757608 HM535799 B3										
313757610 HM535800 B4										
313757612 HM535801 B6										
313757614 HM535802 Ba2bt3										
313757616 HM535803 Ba5bt3										
313757618 HM535804 G3						N				
313757620 HM535805 G4							A		N	
313757622 HM535806 G10									N	N
313757624 HM535807 G12						C				
313757626 HM535808 G14							A		N	
313757628 HM535809 G15										
313757630 HM535810 G16						C				
313757632 HM535811 G17							N		N	
313757634 HM535812 G18							A			
313757636 HM535813 G19						N				
313757638 HM535814 pol11							A			
313757640 HM535815 pol12										
313757642 HM535816 pol13									C	T
313757644 HM535817 pol14										R
313757646 HM535818 pol15										M
313757648 HM535819 pol122										R
313757650 HM535820 pol126										
313757652 HM535821 pol127										
313757654 HM535822 pol141									C	T
313757658 HM535824 pol144										
313757662 HM535826 pol154									C	N
313757664 HM535827 pol155									C	T
313757666 HM535828 pol156										
313757670 HM535830 pol162								TC		R
313757674 HM535832 pol164										
313757680 HM535835 pol175						C				
313757682 HM535836 pol176							N	N		
313757686 HM535838 pol178										
313757690 HM535840 pol1710										
313757692 HM535841 pol1711						N				
313757694 HM535842 pol184										
313757696 HM535843 1				T						T
313757697 HM535844 1.2						R				
313757698 HM535845 1.3				T						Y
313757699 HM535846 1.4						Y	R			
313757700 HM535847 1.6				T						T
313757701 HM535848 1.7							A			
313757702 HM535849 2				T		Y	R			Y
313757703 HM535850 2.2				Y						T
313757704 HM535851 2.3				T			A			T
313757705 HM535852 2.4				T			R			Y
313757706 HM535853 3						C				
313757707 HM535854 3.2				Y		C				
313757708 HM535855 3.3				Y		Y	A			
313757709 HM535856 3.4				Y						C
313757710 HM535857 3.5				Y			A			Y
313757711 HM535858 3.6				T		Y			Y	T
313757712 HM535859 3.7							A			T
313757713 HM535860 3.8				Y			A			Y
313757714 HM535861 3.9				T			A		Y	Y
313757715 HM535862 30				T			A			Y
313757716 HM535863 31				Y		Y	A		Y	Y
313757717 HM535864 32				T			A			T
313757718 HM535865 5.2				Y		Y	R			
313757719 HM535866 5.3							A			
313757720 HM535867 5.4				Y						T
313757721 HM535868 5.5						R				
313757722 HM535869 5.6							A			
313757723 HM535870 5.7						R				
313757724 HM535871 5.8							A			
313757725 HM535872 5.9										
313757726 HM535873 50				T			A			Y
313757727 HM535874 51										
313757728 HM535875 52										
313757729 HM535876 53						R				
313757730 HM535877 54							A			
313757731 HM535878 55							A			
313757732 HM535879 56							A			
313757733 HM535880 57						Y	A			
313757734 HM535881 58						Y	A			
313757735 HM535882 59							R			
313757736 HM535883 5.20				Y		C				
313757737 HM535884 5.21							A			
313757738 HM535885 5.22				Y			A			T
313757739 HM535886 5.23				T			A			
313757740 HM535887 5.24				Y		C	R			T
313757741 HM535888 5.25				Y		Y	R			
313757742 HM535889 5.26				Y		Y	R			
313757743 HM535890 5.27				Y			Y			
313757744 HM535891 7				T			A			T
313757745 HM535892 7.2				Y			A			
313757746 HM535893 7.4				T			A			T
313757747 HM535894 7.6				Y						Y
313757748 HM535895 9				T			A		Y	
313757749 HM535896 9.3				T			A			Y
313757750 HM535897 9.4										
313757751 HM535898 9.5				T			A			Y

Anexo 6

313757752 HM535899 9.7R.
313757753 HM535900 9.8Y.A.....Y.
313757754 HM535901 91Y.R.
313757755 HM535902 92T.A.....Y.
313757756 HM535903 94Y.A.....Y.
313757757 HM535904 95Y.A.....
313757758 HM535905 96Y.A.....Y.Y.
313757759 HM535906 111T.A.....Y.
313757760 HM535907 11.3Y.A.....Y.
313757761 HM535908 11.4Y.A.....Y.
313757762 HM535909 11.5Y.A.....C.T.
313757763 HM535910 11.6Y.A.....Y.
313757764 HM535911 11.7T.Y.R.....Y.
313757765 HM535912 12.2Y.Y.....Y.
313757766 HM535913 12.4Y.A.....Y.
313757767 HM535914 13.2Y.A.....C.T.
313757768 HM535915 13.3Y.Y.....
313757769 HM535916 13.4Y.A.....C.T.
313757770 HM535917 13.5Y.A.....C.T.
313757771 HM535918 13.7Y.Y.R.....Y.
313757772 HM535919 16Y.....Y.Y.
313757773 HM535920 16.2Y.A.....
313757774 HM535921 16.3Y.A.....T.
313757775 HM535922 16.4T.Y.....Y.Y.
313757776 HM535923 16.5Y.A.....C.T.
313757777 HM535924 16.6Y.Y.....T.
313757778 HM535925 16.7T.A.....
313757779 HM535926 17Y.A.....Y.
313757780 HM535927 17.2Y.A.....
313757781 HM535928 17.4Y.A.....Y.
313757782 HM535929 18Y.....T.
313757783 HM535930 18.2A.....
313757784 HM535931 18.3A.....
313757785 HM535932 18.4Y.C.R.....Y.
313757786 HM535933 18.5Y.A.....C.T.
313757787 HM535934 212Y.A.....
313757788 HM535935 213C.....
313757789 HM535936 214A.....
313757790 HM535937 215
313757791 HM535938 216T.A.....
313757792 HM535939 217T.A.....Y.T.
313757793 HM535940 218A.....C.T.
313757795 HM535942 2110A.....
313757796 HM535943 2111A.....
313757797 HM535944 2112A.....
313757798 HM535945 224T.A.....T.
313757799 HM535946 225A.....
313757800 HM535947 24T.A.....T.
313757801 HM535948 24.2Y.Y.....Y.
313757802 HM535949 24.3Y.....C.....Y.
313757803 HM535950 24.4C.....
313757804 HM535951 24.5Y.Y.A.....
313757805 HM535952 24.6Y.A.....Y.Y.
313757806 HM535953 24.7Y.A.....T.
313757807 HM535954 31T.R.....T.
313757808 HM535955 31.4A.....T.
313757809 HM535956 32Y.A.....Y.
313757810 HM535957 32.2A.....T.
313757811 HM535958 33Y.A.....T.
313757812 HM535959 33.2T.A.....T.
313757813 HM535960 34Y.R.....Y.
313757814 HM535961 35Y.R.....Y.T.
313757815 HM535962 36Y.A.....Y.Y.

Anexo 6

	640	650	660	670	680	690	700
313757794 HM535941 219	TGATGGCCGCTTGTGATCCGCGTCA	CGGGCGCTACCTGACAGTTGCCGCCATGTTCCG	TGGTCCGCATGTC				
3				R..Y..Y..Y			
38				Y			
313757606 HM535798 B2				Y			
313757608 HM535799 B3							
313757610 HM535800 B4							
313757612 HM535801 B6							
313757614 HM535802 Ba2bt3				C..T			
313757616 HM535803 Ba5bt3				C..Y			
313757618 HM535804 G3				Y..T			
313757620 HM535805 G4				Y..Y..Y			
313757622 HM535806 G10				C..T..T			
313757624 HM535807 G12				T			
313757626 HM535808 G14				N..Y			
313757628 HM535809 G15				G..C..T..T			
313757630 HM535810 G16				T			
313757632 HM535811 G17				C..T..Y			
313757634 HM535812 G18				Y			
313757636 HM535813 G19				N..C..T..Y			
313757638 HM535814 pol11							
313757640 HM535815 pol12				G..C..T..T			
313757642 HM535816 pol13						S	
313757644 HM535817 pol14							
313757646 HM535818 pol15							
313757648 HM535819 pol22				N..T..Y			
313757650 HM535820 pol26							
313757652 HM535821 pol27				T			
313757654 HM535822 pol41				G..C..T..T			
313757658 HM535824 pol144							
313757662 HM535826 pol154				R..C..T..T			
313757664 HM535827 pol155				N..C..N..T			
313757666 HM535828 pol156		C..T	S	S	A	G	C
313757670 HM535830 pol162							
313757674 HM535832 pol164							
313757680 HM535835 pol175				N			
313757682 HM535836 pol176							
313757686 HM535838 pol178				N			
313757690 HM535840 pol1710							
313757692 HM535841 pol1711							
313757694 HM535842 pol184							
313757696 HM535843 1				C..T			
313757697 HM535844 1..2				R..C			
313757698 HM535845 1..3				C..T..T			
313757699 HM535846 1..4				R..C..T			
313757700 HM535847 1..6				Y..T..Y			
313757701 HM535848 1..7				Y..Y			
313757702 HM535849 2				Y..Y			
313757703 HM535850 2..2				C..T..Y			
313757704 HM535851 2..3				T..Y			
313757705 HM535852 2..4				R..Y..T			
313757706 HM535853 3				T			
313757707 HM535854 3..2				R..Y			
313757708 HM535855 3..3							
313757709 HM535856 3..4				Y..Y			
313757710 HM535857 3..5				Y..Y..Y			
313757711 HM535858 3..6				Y			
313757712 HM535859 3..7				R..Y..Y			
313757713 HM535860 3..8				Y..M			
313757714 HM535861 3..9				Y..Y			
313757715 HM535862 30				R..Y..T..Y			
313757716 HM535863 31				Y..Y			
313757717 HM535864 32				C..Y			
313757718 HM535865 5..2				Y			
313757719 HM535866 5..3				C..Y			
313757720 HM535867 5..4				C..T..Y			
313757721 HM535868 5..5				Y..Y			
313757722 HM535869 5..6				C..T			
313757723 HM535870 5..7				C..Y			
313757724 HM535871 5..8				Y..Y			
313757725 HM535872 5..9				Y..Y..Y			
313757726 HM535873 50				Y..Y			
313757727 HM535874 51				Y..Y			
313757728 HM535875 52				R..Y..Y			
313757729 HM535876 53				Y..Y			
313757730 HM535877 54				R..C..Y			
313757731 HM535878 55				C			
313757732 HM535879 56				C..Y..Y			
313757733 HM535880 57				Y			
313757734 HM535881 58				Y..T			
313757735 HM535882 59				C..Y..M			
313757736 HM535883 5..20				Y			
313757737 HM535884 5..21				Y..Y..Y			
313757738 HM535885 5..22				C..Y..Y			
313757739 HM535886 5..23				C			
313757740 HM535887 5..24				Y..Y			
313757741 HM535888 5..25				R..C..Y			
313757742 HM535889 5..26				C..Y..Y			
313757743 HM535890 5..27				C..Y			
313757744 HM535891 7				G..C	T		
313757745 HM535892 7..2				T			
313757746 HM535893 7..4				C..Y			
313757747 HM535894 7..6				Y..T..Y			
313757748 HM535895 9				Y			
313757749 HM535896 9..3				Y..Y..Y			
313757750 HM535897 9..4				Y..M			
313757751 HM535898 9..5				Y..Y			

Anexo 6

313757752 HM535899 9.7Y..T..Y.....
313757753 HM535900 9.8Y..Y.....
313757754 HM535901 91Y..Y.....
313757755 HM535902 92Y..Y..Y.....
313757756 HM535903 94Y..Y.....
313757757 HM535904 95Y..Y.....
313757758 HM535905 96Y..T.....
313757759 HM535906 111Y..T.....
313757760 HM535907 11.3Y..Y..Y.....
313757761 HM535908 11.4Y..Y.....
313757762 HM535909 11.5G..C..T..T.....
313757763 HM535910 11.6Y..Y.....
313757764 HM535911 11.7Y..T..Y.....
313757765 HM535912 12.2G..C..T..Y.....
313757766 HM535913 12.4Y..Y.....
313757767 HM535914 13.2G..C..T..T.....
313757768 HM535915 13.3Y..Y.....
313757769 HM535916 13.4G..C..T..T.....
313757770 HM535917 13.5G..C..T..T.....
313757771 HM535918 13.7T..Y.....
313757772 HM535919 16C..Y..Y.....
313757773 HM535920 16.2Y..Y..Y.....
313757774 HM535921 16.3Y..Y.....
313757775 HM535922 16.4Y..Y.....
313757776 HM535923 16.5G..C..T..Y.....
313757777 HM535924 16.6Y..T.....
313757778 HM535925 16.7Y..Y.....
313757779 HM535926 17Y..Y.....
313757780 HM535927 17.2Y..Y.....
313757781 HM535928 17.4Y..Y.....
313757782 HM535929 18G..C..T..T.....
313757783 HM535930 18.2Y..Y.....
313757784 HM535931 18.3Y..Y.....
313757785 HM535932 18.4Y..Y.....
313757786 HM535933 18.5G..C..T..T.....
313757787 HM535934 212Y..Y.....
313757788 HM535935 213Y..Y.....
313757789 HM535936 214T.....
313757790 HM535937 215Y..Y.....
313757791 HM535938 216C.....
313757792 HM535939 217C.....
313757793 HM535940 218C.....
313757795 HM535942 2110Y.....
313757796 HM535943 2111C..T.....
313757797 HM535944 2112C..Y.....
313757798 HM535945 224Y..Y.....
313757799 HM535946 225Y..T..Y.....
313757800 HM535947 24Y..Y.....
313757801 HM535948 24.2R..Y.....
313757802 HM535949 24.3Y.....
313757803 HM535950 24.4Y.....
313757804 HM535951 24.5T..Y.....
313757805 HM535952 24.6R..Y..T.....
313757806 HM535953 24.7Y..Y.....
313757807 HM535954 31Y..Y..M.....
313757808 HM535955 31.4C.....
313757809 HM535956 32T..Y.....
313757810 HM535957 32.2Y..Y.....
313757811 HM535958 33Y..Y.....
313757812 HM535959 33.2Y..Y.....
313757813 HM535960 34G..C..T..T.....
313757814 HM535961 35G..C..T..Y.....
313757815 HM535962 36G..C..T..Y.....

Nota:

- 313757610|HM535800|B4: HM535800|B4, HM535833|pol65
- 313757690|HM535840|pol710: HM535840|pol710, HM535839|pol79
- 313757783|HM535930|18.2: HM535930|18.2, HM535834|pol71, HM535829|pol161, HM535837|pol77, HM535825|pol51, HM535823|pol42